



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade NOVA de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Imunonanodiagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis* (PPc):  
uma abordagem inovadora baseada na associação de biossensores  
antigénicos e nanopartículas de ouro

**Ana Luísa Regatão Tomás**

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,  
ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**DEZEMBRO, 2019**





INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Imunonanodiagnóstico da pneumonia por  
*Pneumocystis* (PPc): uma abordagem inovadora baseada  
na associação de biossensores antigénicos e  
nanopartículas de ouro

**Autor:** Ana Luísa Regatão Tomás

**Orientador:** Professora Doutora Olga Maria Guerreiro de Matos (IHMT/UNL)

**Coorientador:** Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares (FCT/UNL)

Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade em Biologia Celular e Molecular.

Apoio financeiro de Fundação para a Ciência e Tecnologia, através da bolsa de  
doutoramento SFRH/BD/108433/2015





## **Lista de elementos bibliográficos relacionados com a presente dissertação**

### **Artigos publicados em revistas de circulação internacional com arbitragem científica, diretamente relacionados com o trabalho apresentado nesta dissertação:**

Tomás AL, Cardoso F, Esteves F, Matos O. Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Scientific Reports*. 2016; 6, 36287; doi: 10.1038/srep36287.

Tomás AL, de Almeida MP, Cardoso F, Pinto M, Pereira E, Franco R, Matos O. Development of a gold nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for *Pneumocystis pneumonia* serological diagnosis at point-of-care. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10:2917. doi: 10.3389/fmicb.2019.02917.

Tomás AL, Cardoso F, de Sousa B, Matos O. Detection of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in human serum using a recombinant synthetic multi-epitope kexin-based antigen. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020; doi:10.1007/s10096-020-03936-2.

### **Resumos publicados em revista de circulação internacional com arbitragem científica, diretamente relacionados com o trabalho apresentado nesta dissertação:**

Tomás AL, Cardoso F, de Almeida MP, Pereira E, Franco R, Matos O. An immunonanodiagnostic approach for *Pneumocystis pneumonia* at point-of-care. In: Gangneux JP, Lortholary O, Cornely OA, Pagano L. 9th Trends in Medical Mycology Held on 11–14 October 2019, Nice, France, Organized under the Auspices of EORTC-IDG and ECMM. *Journal of Fungi*. 2019; 5(4), 95. pp. 179.

Tomás AL, Pinto M, Cardoso F, de Almeida MP, de Sousa B, Pereira E, Franco R, Matos O. Application of synthetic recombinant multi-epitope antigens and gold nanoparticles for a *Pneumocystis pneumonia* rapid diagnostic test. *Annals of Medicine*. 2019; 51:sup1, 92 doi: 10.1080/07853890.2018.1561853.

**Patente Nacional, diretamente relacionada com o trabalho apresentado nesta dissertação:**

Matos OMG, Cardoso FMH, Esteves FVC, Tomás ALR. Antígeno recombinante sintético de *Pneumocystis jirovecii* e suas aplicações, PT109078, submetida a 01-11-2016, concedida a 15-04-2020.

**Comunicações orais e pósteres apresentados em reuniões científicas, diretamente relacionados com o trabalho apresentado nesta dissertação:**

Tomás AL et al. (2019) Plataforma point-of-care inovadora baseada num bionanossensor para o diagnóstico serológico da pneumonia por *Pneumocystis*. X Jornadas Científicas do IHMT, Lisboa, Portugal. Póster.

Tomás AL et al. (2019) An immunonodiagnostic approach for *Pneumocystis* pneumonia at point-of-care. 9th Trends in Medical Mycology, Nice, França. Póster

Tomás AL et al. (2019) Application of synthetic recombinant multi-epitope antigens in a gold bionanoconjugate-based point-of-care platform for serological diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. Encontro Ciência 2019, Lisboa, Portugal. Póster.

Tomás AL et al. (2018) Plataforma point-of-care inovadora baseada num bionanossensor para o diagnóstico serológico da pneumonia por *Pneumocystis*. IX Jornadas Científicas do IHMT, Lisboa, Portugal. Comunicação Oral.

Tomás AL et al. (2018) Application of synthetic recombinant multi-epitope antigens in an innovative point-of-care platform for serodiagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. Encontro Ciência 2018, Lisboa, Portugal. Comunicação Oral.

Tomás AL et al. (2018) Gold Bionanoconjugate-based Point-of-Care Platform for Serological Diagnosis of *Pneumocystis Pneumonia*. Encontro Ciência 2018, Lisboa, Portugal. Póster.

Tomás AL et al. (2018) Application of synthetic recombinant multi-epitope antigens and gold nanoparticles for a *Pneumocystis* pneumonia rapid diagnostic test. 3rd International Congress of CiiEM – Research and Innovation in Human & Health Science, Caparica, Portugal. Comunicação Oral.

Tomás AL et al. (2018). Point-of-care innovative platform based on a serological bionanosensor for *Pneumocystis* pneumonia. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Madrid, Espanha. Póster.

Tomás AL et al. (2017) Imunonodiagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis*: uma abordagem inovadora baseada na associação de biossensores antigénicos e nanopartículas de ouro. VIII Jornadas Científicas do IHMT, Lisboa, Portugal. Póster.

Tomás AL et al. (2017). Utilização de antígenos sintéticos de *Pneumocystis jirovecii* no imunodiagnóstico da pneumocistose. 4º Congresso Nacional de Medicina Tropical-1º Encontro Lusófono de sida, tuberculose e outras doenças oportunistas, Lisboa, Portugal. Comunicação Oral.

Tomás AL et al. (2017) Association of synthetic recombinant multi-epitope antigens of *Pneumocystis jirovecii* and gold nanoparticles for the immunodiagnosis of Pneumocystosis at the point-of-care. Encontro Ciência 2017, Lisboa, Portugal. Póster.

Tomás AL et al. (2017). Application of synthetic recombinant multi-epitope antigens of *Pneumocystis jirovecii* in the immunodiagnosis of Pneumocystosis. XIV International Workshops on Opportunistic Protists (IWOP-14), Cincinnati, Estados Unidos. Póster.

Tomás AL et al. (2016) Imunonodiagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis*: uma abordagem inovadora baseada na associação de biossensores antigénicos e nanopartículas de ouro. VII Jornadas Científicas do IHMT, Lisboa, Portugal. Póster.

Tomás AL et al. (2016) Development of an innovative approach for immunonodiagnosis of *Pneumocystis* pneumonia at the point-of-care. Encontro Ciência 2016, Lisboa, Portugal. Póster.

Tomás AL et al. (2016) Imunonodiagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis*: uma abordagem inovadora baseada na associação de biossensores antigénicos e nanopartículas de ouro. XI Congresso Nacional de VIH/SIDA & XIII Congresso Nacional de Doenças Infeciosas e Microbiologia Clínica, Coimbra, Portugal. Póster.

**Artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica, parcialmente relacionado com o trabalho apresentado nesta dissertação:**

Tomás AL, Matos O. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: Current Advances in Laboratory Diagnosis. *OBM Genetics*. 2018; 2(4):049; doi:10.21926/obm.genet.1804049.

**Capítulo de livro publicado por editora internacional, parcialmente relacionado com o trabalho apresentado nesta dissertação:**

Matos O, Tomás AL, Antunes F. *Pneumocystis jirovecii* and Pneumocystosis. In: Current Progress in Medical Mycology. Mora-Montes H, Lopes-Bezerra L (eds.), Springer International Publishing 2017. Capítulo 7: 215-254. ISBN (eBook): 978-3-319-64113-3.

*Aos meus pais.*

“Behind every young child who believes in himself is a parent who believed first”

*Matthew Jacobson*

*À ciência.*

“Fazei com que eu seja moderado em tudo, mas insaciável no meu amor pela ciência”

*Moisés Maimónides*



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar tenho de agradecer aos meus pais, os verdadeiros criadores da pessoa que sou hoje: a guerreira que aprendeu a acreditar em si e a não desistir de procurar um futuro melhor para mim e para os meus. Obrigada por todo o apoio e amor constantes, sem os quais não teria certamente chegado até aqui. Este trabalho também é vosso.

Em segundo lugar, e porque o primeiro lugar do pódio estará sempre ocupado pelos meus pais, à minha orientadora Professora Doutora Olga Matos. Sem o seu incentivo e tremenda crença nas minhas capacidades eu não sei se teria tido coragem de ingressar nesta jornada. Foi a Professora que me lembrou que merecia mais, que podia mais e que devia isso não só a mim como a todos aqueles que tinham acreditado em mim e me feito crescer até então. E você foi, sem dúvida, uma dessas pessoas. Muito obrigada pela confiança, amizade e aprendizagem que me transmitiu ao longo de todo este tempo. Espero não desiludir.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Ricardo Franco, obrigada por ter aceite participar neste projecto e por todo o incentivo, paciência e disponibilidade que me ofereceu ao longo destes 4 anos e que tornaram possível que eu hoje mostrasse que com boas parcerias, se faz boa ciência.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), agradeço o apoio financeiro dado através da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/108433/2015), sem a qual eu não teria tido possibilidade de me dedicar a 100% a este projeto.

Ao Investigador Fernando Cardoso, pelo apoio, disponibilidade inegável e entusiasmo na participação deste projeto, o meu muito obrigado.

Ao meu colega Doutor Miguel Peixoto de Almeida e à Prof. Doutora Eulália Perreira, parceiros do Norte neste projeto, obrigada pela disponibilidade e dedicação na boa persecução do mesmo.

Ao Professor Doutor Bruno de Sousa, agradeço a prontidão e incansável ajuda dada ao nível da análise estatística dos dados obtidos neste trabalho e por todo o entusiasmo e positivismo que sempre me transmitiu ao longo das várias etapas de publicação dos resultados.

Aos membros da minha comissão tutorial que ainda não foram mencionados, ao Doutor

Carlos Novo e à Doutora Maria Manuela Gaspar, o meu obrigado por terem aceite participar neste projeto e por todo o apoio prestado ao longo do mesmo.

Ao Dr. Moussa Elbayoumy, as minhas sinceras desculpas por todos os neologismos que criei na língua inglesa e os meus mais sinceros agradecimentos pela disponibilidade constante para revisão e edição linguística das publicações escritas no âmbito deste trabalho.

A todo o Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa, agradeço o acolhimento e a providência das condições necessárias à realização deste trabalho. Em especial à Doutora Maria Luísa Lobo, colega e amiga para a vida, obrigada pela companhia, gargalhadas e suporte dado ao longo destes 4 anos.

A todos os “Bionanos” do laboratório Bionano@UCIBIO/FCT-UNL, especialmente à bionano Maria João, o meu obrigado por todo o apoio, companheirismo e disponibilidade sempre que precisei.

Aos meus companheiros de doutoramento, Gonçalo Seixas, Samira D’Almeida, Joana Couto e Ana Bolas, agradeço o companheirismo, a força, o consolo e o encorajamento ao longo desta etapa. Parabéns, aos que já concluíram esta caminhada e força para os que vêm no caminho. Nós conseguimos.

Às minhas companheiras das aulas de zumba e em especial à Professora Liliana Silva, obrigada pelo escape que criavam às dificuldades, tristezas e preocupações de um final de dia no laboratório quando os resultados não apareciam.

Ao meu Oreo, que surgiu na fase mais difícil da minha vida e a preeheu de côr, alegria, diversão e um amor incondicional que não conhecia.

Aos meus amigos e restantes familiares que estiveram envolvidos na minha vida durante estes longos 4 anos e que, de algum modo, me deram força ou fizeram acreditar que seria capaz de tudo isto. Vocês sabem quem são. Obrigada!



## Resumo

*Pneumocystis jirovecii* é um fungo oportunista, de distribuição mundial, capaz de provocar pneumonia fatal em imunocomprometidos. Atualmente, o diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) baseia-se na visualização microscópica de *P. jirovecii* e/ou na detecção do seu ADN em amostras respiratórias obtidas por métodos dispendiosos e invasivos. Assim, o desenvolvimento de um método de diagnóstico simples, rápido, económico e menos invasivo, é uma necessidade premente. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver abordagens alternativas de serodiagnóstico da PPc, aplicando antígenos recombinantes sintéticos (ARS) multi-epítipo específicos de *P. jirovecii* na detecção de anticorpos séricos anti-*P. jirovecii* em doentes com e sem infeção por este microrganismo. Dois ARS foram desenhados com base no estudo *in silico* da imunogenicidade da glicoproteína major de superfície (Msg, *major surface glycoprotein*) e da serina protease Kex1 de *P. jirovecii*, duas proteínas com propriedade antigénicas descritas. Após síntese e purificação, esses ARS foram aplicados como ferramentas antigénicas no desenvolvimento e otimização de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*) indiretos para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*P. jirovecii* em amostras de soro de doentes previamente classificados em grupos clínicos distintos. Seguidamente, realizou-se uma avaliação do desempenho diagnóstico dos ELISA desenvolvidos. Esses ARS foram também conjugados com AuNP previamente funcionalizadas e a interação desses bioconjugados com anticorpos séricos anti-*P. jirovecii* foi caracterizada por ensaios de eletroforese em gel de agarose (EGA), na presença e ausência de agentes de bloqueamento. Por fim, os bioconjugados foram aplicados na otimização de testes de tiras projetados para detetar anticorpos séricos da classe IgM reativos contra cada um dos ARS produzidos, tendo sido criada uma zona teste com anticorpos anti-IgM humana e uma zona controlo com anticorpos anti-ARS. ELISA desenvolvidos com ambos os ARS mostraram que somente os níveis serológicos de anticorpos da classe IgM estavam significativamente aumentados em doentes com PPc em comparação com doentes sem infeção por este microrganismo. Adicionalmente, o desempenho dos testes ELISA baseados na detecção do nível desses anticorpos no diagnóstico da PPc apresentou sensibilidades de 68.0% e 70.8% e especificidades de 61.8% e 75.0% com o ARS da Msg e o ARS da Kex1, respetivamente. Os ensaios de EGA mostraram que os bioconjugados, após bloqueamento apropriado com caseína, eram capazes de interagir especificamente com anticorpos anti-*P. jirovecii* presentes no soro de doentes. Os testes de tira desenvolvidos, testados com soros de doentes com e sem infeção por *P. jirovecii*, apresentaram resultados concordantes com o desempenho esperado, nomeadamente linhas vermelhas na zona teste e controlo com amostras de doentes e apenas uma linha vermelha na zona controlo com amostras de indivíduos sem a doença. Estes resultados suportam a possibilidade de se diagnosticar PPc utilizando os ARS produzidos como ferramentas para detecção serológica de anticorpos IgM anti-*P. jirovecii*. As alternativas de diagnóstico aqui apresentadas devem ser otimizadas e validadas para sua posterior implementação na prática clínica, esperando-se um impacto positivo não apenas nas regiões economicamente desenvolvidas, mas também nas comunidades de baixa renda e com acesso escasso às tecnologias existentes para o diagnóstico desta doença oportunista potencialmente fatal.

**Palavras-chave:** Pneumonia por *Pneumocystis*, antígenos recombinantes sintéticos, ELISA, nanopartículas de ouro, testes imunocromatográficos.



## Abstract

*Pneumocystis jirovecii* is a ubiquitous opportunistic fungus able to cause fatal pneumonia in immunocompromised patients. Currently, *Pneumocystis* pneumonia (PcP) diagnosis relies on microscopic visualization of *P. jirovecii* organisms or its DNA detection in respiratory specimens obtained by invasive and costly techniques. Thus, the development of a simpler, faster, cost-effective and less-invasive diagnostic approach is mandatory. In this context, this work aimed to develop alternative serodiagnostic approaches for PcP, applying innovative *P. jirovecii* recombinant synthetic (multi-epitope) antigens (RSA) in the detection of specific anti-*P. jirovecii* antibodies in human serum specimens. Two RSA were designed based on the immunogenicity of *P. jirovecii* major surface glycoprotein (Msg) and kexin-like serine protease (Kex1), two highly antigenic proteins of this pathogen. After synthesis and purification, these RSA were applied as antigenic tools in indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for detection of serum anti-*P. jirovecii* antibodies in patients previously classified in distinct clinical groups. A diagnostic performance assessment of each RSA-based ELISA was performed. The RSA were also conjugated with previously functionalized AuNP and the interaction of these bioconjugates with specific anti-*P. jirovecii* antibodies was characterized by agarose gel electrophoresis (AGE), in the presence and absence of blocking agents. Then, the bioconjugates were used in the development of two strip-based lateral flow immunoassays, comprising a test zone with anti-human IgM antibodies and a control zone with anti-RSA antibodies, projected to detect the presence of human IgM antibodies reactive to each *P. jirovecii* RSA produced. ELISA results with both RSA showed that only IgM anti-*P. jirovecii* levels were significantly increased in patients with PcP compared with patients without *P. jirovecii* infection. In addition, these IgM RSA-based ELISA allowed a diagnostic performance of PcP with sensitivities of 68.0% and 70.8% and specificities of 61.8% and 75.0% with Msg RSA and Kex1 RSA, respectively. AGE assays showed that after proper blocking with casein, the bioconjugates were able to react specifically with anti-*P. jirovecii* antibodies present in patients sera. The strip-based tests developed were tested with pools of sera from patients with PcP (positive sample) and from patients without *P. jirovecii* infection (negative sample). Both samples showed the expected performance namely test and control red-colored lines with the positive sample and only a control red-colored line with the negative sample. These results support the possibility to diagnose PcP using the designed RSA as recognition tools and IgM anti-*P. jirovecii* antibodies as targets for immunodiagnosis. Optimization and validation of the alternative diagnostic approaches presented in this study are necessary in order to enable their implementation in clinical practice. A positive impact is expected not only on economically advanced regions, but also on low-income communities with scarce access to the technologies currently available to diagnose this life-threatening opportunistic disease.

**Keywords:** *Pneumocystis* pneumonia, recombinant synthetic antigens, ELISA, gold nanoparticles, lateral flow immunoassays.



## Índice

Lista de elementos bibliográficos relacionados com a presente dissertação .....	iii
Dedicatória .....	vii
Agradecimentos .....	ix
Resumo .....	xi
Abstract .....	xiii
Índice .....	xv
Índice de Figuras .....	xxi
Índice de Quadros .....	xxv
Índice de Equações .....	xxvii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos .....	xxix
 Capítulo 1. Introdução Geral .....	 1
1.1 Pneumonia por <i>Pneumocystis</i> .....	3
1.1.1 Espécies e taxonomia .....	3
1.1.2 Biologia de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	7
1.1.2.1 Morfologia e ciclo de vida .....	7
1.1.2.2 Transmissão .....	10
1.1.3 Fisiopatologia da infeção por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	14
1.1.3.1 Resposta imunitária do hospedeiro à infeção por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	15
1.1.3.2 Mecanismos de evasão à resposta imunitária do hospedeiro .....	18
1.1.4 Manifestações clínicas da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	20
1.1.5 Dados epidemiológicos e importância clínica da infeção por <i>Pneumocystis jirovecii</i> na saúde pública mundial .....	21
1.1.6 Diagnóstico da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	24
1.1.6.1 Amostras biológicas .....	25
1.1.6.2 Técnicas de coloração .....	26
1.1.6.3 Diagnóstico molecular .....	27

1.1.7 Tratamento e profilaxia da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	32
1.1.7.1 Tratamento .....	32
1.1.7.2 Profilaxia .....	34
1.2 Estratégias alternativas de diagnóstico da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	36
1.2.1 Detecção de anticorpos reativos contra antígenos recombinantes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	39
1.2.1.1 Tecnologia de produção de antígenos recombinantes para ensaios imunológicos .....	46
1.3 Nanopartículas de ouro e bioconjugados: aplicação em diagnóstico clínico .....	49
1.3.1 Propriedades e síntese de AuNP .....	49
1.3.2 Funcionalização de AuNP .....	53
1.3.3 Bioconjugação de AuNP .....	54
1.3.4 Bioconjugados AuNP-proteína: otimização e caracterização .....	57
1.3.4.1 Caracterização de conjugados AuNP-proteína por eletroforese em gel de agarose .....	58
1.3.5 Aplicação de bioconjugados em diagnóstico clínico .....	61
1.4 Imunonanodiagnóstico: detecção de anticorpos em ensaios de fluxo lateral .....	64
1.4.1 Ensaios de fluxo lateral: composição e formatos .....	65
1.4.2 Aplicação de AuNP em imunoenaios de fluxo lateral: exemplo prático do imunonanodiagnóstico da PPc .....	70
1.5 Objetivos da presente dissertação .....	72
1.6 Referências .....	73

<b>Capítulo 2. Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....</b>	<b>117</b>
Abstract .....	119
Introduction .....	119
Materials and Methods .....	120
Clinical samples .....	120

Selection and cloning of the recombinant synthetic antigen (RSA) sequence .....	120
Expression and purification of the Recombinant Synthetic Antigen ....	121
SDS-PAGE and ELISA analysis .....	121
Statistical analysis of data .....	121
Results .....	121
Sampling characterization .....	121
Recombinant synthetic antigen production and purification .....	122
Detection/quantification of anti- <i>P. jirovecii</i> antibodies in human serum .....	122
Discussion .....	122
References .....	125
Acknowledgments .....	126
Author Contributions .....	126
Additional Information .....	126

### **Capítulo 3. Development of a gold nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for *Pneumocystis pneumonia* serological diagnosis at point-of-care .....**

Abstract .....	129
Introduction .....	130
Materials and Methods .....	131
Production of <i>P. jirovecii</i> 's Recombinant Synthetic Antigens (RSA) and Anti-RSA Antibodies .....	131
RSA Production and Expression .....	131
Polyclonal Anti-RSA Antibodies Production .....	131
Human Serum Specimens .....	131
ELISA for Detection of Anti- <i>P. jirovecii</i> 's Antibodies .....	132
Synthesis and Functionalization of Spherical Gold Nanoparticles .....	133
Conjugation of AuNPs With the RSA .....	133
Analysis of Human Sera Interaction With AuNP-RSA by Agarose Gel Electrophoresis .....	133

Assembly of LFIA Strips for Detection of IgM Anti- <i>P. jirovecii</i> Antibodies in Human Sera .....	134
Absorbent Pad and Membrane Selection .....	134
Conjugate Pad, Sample Pad and Sample Buffer and Dilution Selection .....	134
Quantification of Color Intensity .....	135
LFIA Strips Testing With Clinical Samples .....	135
Results .....	135
Design, Expression, and Purification of Msg and Kex1 RSA .....	135
Detection of Serum Anti- <i>P. jirovecii</i> Antibodies .....	135
Characterization of Gold Nanoparticles .....	136
Gold Nanoparticle- <i>P. jirovecii</i> 's RSA Conjugates (AuNP-RSA) .....	136
Blocking of AuNP-RSA Conjugates for Reaction With Human Sera ...	136
Interaction Between Human Sera and AuNP-RSA-Casein Conjugates .	138
Assembly and Optimization of LFIA Strips Using AuNP-RSA-Casein Conjugates .....	139
Absorbent Pad and Membrane Selection and Optimization ....	139
Conjugate and Sample Pad Selection and Optimization .....	139
Sample Buffer and Dilution Selection .....	141
Optimized LFIA Strips Testing With Human Sera Pools .....	141
Discussion .....	141
Conclusion .....	145
Data Availability Statement .....	146
Ethics Statement .....	146
Author Contributions .....	146
Funding .....	146
Acknowledgments .....	146
Supplementary Material .....	146
References .....	146



<b>Capítulo 4. Detection of anti-<i>Pneumocystis jirovecii</i> antibodies in human serum using a recombinant synthetic multi-epitope kexin-based antigen .....</b>	<b>149</b>
Abstract .....	151
Introduction .....	151
Material and Methods .....	152
Results .....	152
Discussion .....	152
Author Contributions .....	154
Funding information .....	154
Compliance with ethical standards .....	154
Conflict of Interest .....	154
References .....	154
 <b>Capítulo 5. Discussão Geral e Conclusões .....</b>	<b>157</b>
<b>5.1</b> Discussão geral .....	159
<b>5.2</b> Conclusões e perspectivas futuras .....	173
<b>5.3</b> Referências .....	176
 <b>Anexos .....</b>	<b>183</b>
Anexo I .....	185
Anexo II .....	197



## Índice de Figuras

### Capítulo 1

<b>Figura 1.</b> Classificação taxonómica atual abreviada da espécie de <i>Pneumocystis</i> que infeta o ser humano .....	5
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Pneumocystis jirovecii</i> no alvéolo pulmonar .....	8
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das principais estruturas da forma trófica de uma célula de <i>P. jirovecii</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática das principais estruturas dos ascos de <i>P. jirovecii</i> .....	10
<b>Figura 5.</b> Gráfico representativo da frequência de diagnóstico das doenças definidoras de sida mais comuns em Portugal entre 2009 e 2018 .....	23
<b>Figura 6.</b> Fotografias de ascos de <i>Pneumocystis</i> corados pela técnica de metenamina prata (A) e pela técnica de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (B), observados com a ampliação de x1000 .....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema ilustrativo dos passos envolvidos no processo de síntese, expressão e purificação de antígenos recombinantes .....	47
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo do fenómeno de ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR) das AuNP .....	50
<b>Figura 9.</b> Variação da cor de suspensões de AuNP com diferentes tamanhos e do pico de absorção das bandas LSPR na presença de AuNP monodispersas <i>versus</i> AuNP agregadas .....	51
<b>Figura 10.</b> Estrutura do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) .....	54
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática de diferentes abordagens de bioconjugação .....	57
<b>Figura 12.</b> Esquema ilustrativo geral da composição de um LFA .....	66
<b>Figura 13.</b> Esquema ilustrativo do formato tradicional (A) e de um formato alternativo (B) de imunoensaios de fluxo lateral para pesquisa de anticorpos na amostra em estudo .....	70

### Capítulo 2

<b>Figure 1.</b> Msg RSA .....	122
<b>Figure 2.</b> Statistical analysis of the antibodies distribution .....	123
<b>Figure 3.</b> ROC curves of ELISA assays .....	123

## Capítulo 3

<b>Figure 1.</b> Illustration of LFIA strips developed in this study, showing its various components and the expected results in positive and negative tests .....	132
<b>Figure 2.</b> Assessment of the RSA expression and purification process .....	136
<b>Figure 3.</b> Boxplots with IgG and IgM anti- <i>P. jirovecii</i> levels results across patients with PcP and patients without <i>P. jirovecii</i> infection .....	137
<b>Figure 4.</b> AuNP-RSA conjugates formation .....	138
<b>Figure 5.</b> Interaction of AuNP-Msg-Casein (A, B) and AuNP-Kex1-Casein conjugates (C, D) with sera pools from patients with and without <i>P. jirovecii</i> infection .....	139
<b>Figure 6.</b> Comparative analysis of the results from LFIA strips containing AuNP-Msg-Casein conjugates (A, B) and AuNP-Kex1-Casein conjugates (C, D) in the presence (after treatment) and absence (before treatment) of conjugate and sample pad pre-treatments .....	140
<b>Figure 7.</b> Comparative analysis of the results from LFIA strips containing AuNP-Msg-Casein conjugates (A, B) and AuNP-Kex1-Casein conjugates (C, D), after applying the positive sample in different dilutions .....	142
<b>Figure 8.</b> Comparative analysis of the results from LFIA strips containing AuNP-Msg-Casein conjugates (A, B) and AuNP-Kex1-Casein conjugates (C, D), after elution of a positive (+) or a negative (-) sample .....	143

## Capítulo 4

<b>Figure 1.</b> Simple boxplots showing the reactivity levels (OD at 405 nm) of IgG (a) and IgM (b) anti- <i>P. jirovecii</i> antibodies detected by ELISA protocols applied with the Kex1 RSA across patients with PcP and patients with pneumonia due to other cases (no PcP). .....	153
<b>Figure 2.</b> Representation of Kex1-based IgM ELISA ROC curve .....	153

## Anexos

### Anexo I

<b>Supplementary figure S1.</b> Alignment of the nucleotide sequence of the MsgC portion from GenBank AF033211 and JN792933.1 .....	186
<b>Supplementary figure S2.</b> Alignment of the amino acid sequences of the MsgC from GenBank AF033211 and JN792933.1 .....	187
<b>Supplementary figure S3.</b> Alignment of the amino acid sequences of the Msg from GenBank AF033211 and JN792933.1 and the three amino acid sequences of the regions selected to produce the final Msg RSA .....	188

<b>Supplementary figure S4.</b> Representation of hydrophilic behaviour of the RSA designed according to Kyle & Doolittle hydropathic scale .....	189
<b>Supplementary figure S5.</b> Representation of polarity of the RSA designed according to Zimmerman scale .....	190
<b>Supplementary figure S6.</b> Representation of accessibility of the residues of the RSA designed .....	191
<b>Supplementary figure S7.</b> Representation of antigenicity profile of the RSA designed according to Hopp & Woods scale .....	192
<b>Supplementary figure S8.</b> Representation of the average flexibility profile of the residues of the RSA designed .....	193
<b>Supplementary figure S9.</b> Representation of the putative position on the cytoplasmic membrane of the amino acids present in the RSA designed, through CBS – TMHMM – version 2.0 software .....	194

## Anexo II

<b>Supplementary Figure 1.</b> Representation of hydrophilic behaviour of the Kex1 RSA according to Kyle & Doolittle hydropathic scale .....	197
<b>Supplementary Figure 2.</b> Representation of polarity of the Kex1 RSA according to Zimmerman scale .....	198
<b>Supplementary Figure 3.</b> Representation of accessibility of the residues of the Kex1 RSA .....	199
<b>Supplementary Figure 4.</b> Representation of antigenicity profile of the Kex1 RSA according to Hopp & Woods scale .....	200
<b>Supplementary Figure 5.</b> Representation of the average flexibility profile of the residues of the Kex1 RSA .....	201
<b>Supplementary Figure 6.</b> Representation of the putative position on the cytoplasmic membrane of the amino acids present in the Kex1 RSA, through CBS – TMHMM – version 2.0 software .....	202
<b>Supplementary Figure 7.</b> Alignment of the amino acid sequences of the Kex1 protein from GenBank AAN12365.1 and AAM97495.1 and the three amino acid sequences of the regions selected to produce the final Kex1 RSA .....	203
<b>Supplementary Figure 8.</b> Representation of indirect ELISA using anti-polyhistidine antibodies measurements (OD 405nm), throughout the purification process of Msg (orange) and Kex1 (green) RSA .....	204
<b>Supplementary Figure 9.</b> AuNPs characterization through UV-Vis and NTA .....	205
<b>Supplementary Figure 10.</b> AuNP-Msg-BSA and AuNP-Msg-Casein conjugates formation .....	206

<b>Supplementary Figure 11.</b> AuNP-Kex1-BSA and AuNP-Kex1-Casein conjugates formation .....	207
<b>Supplementary Figure 12.</b> AuNP-Msg-BSA-HumanSerum and AuNP-Msg-Casein-HumanSerum conjugates formation .....	208
<b>Supplementary Figure 13.</b> AuNP-Kex1-BSA-HumanSerum and AuNP-Kex1-Casein-HumanSerum conjugates formation .....	209
<b>Supplementary Figure 14.</b> Interaction of blocked and unblocked AuNP-Msg (A, B) and AuNP-Kex1 (C, D) conjugates with sera pools from patients with and without <i>P. jirovecii</i> infection .....	210
<b>Supplementary Figure 15.</b> Digital pictures of the triplicate experiments of LFIA strips containing AuNP-Msg-Casein conjugates and AuNP-Kex1-Casein conjugates, tested with sera from patients with (positive samples) and without (negative samples) PcP .....	211

# Índice de Quadros

## Capítulo 1

<b>Quadro 1.</b> Métodos laboratoriais clássicos aplicados ao diagnóstico da PPc e suas características principais .....	30
<b>Quadro 2.</b> Fármacos mais comumente utilizados no tratamento da PPc e suas respectivas ações .....	33
<b>Quadro 3.</b> Diretrizes para implementação de profilaxia primária e secundária em doentes infectados por VIH .....	35
<b>Quadro 4.</b> Características e principais conclusões de estudos baseados na detecção de anticorpos reativos contra antígenos recombinantes da Msg e Kex1 de <i>P. jirovecii</i> .....	42
<b>Quadro 5.</b> Características principais da glicoproteína major de superfície e da protease de serina kexina 1 de <i>P. jirovecii</i> , assim como dos seus antígenos recombinantes .....	45

## Capítulo 2

<b>Table 1.</b> Clinical, immunological and laboratory information of the 88 patients previously studied, with suspicion of PcP .....	120
<b>Table 2.</b> Statistical measures calculated for different cut-offs studied .....	124
<b>Table 3.</b> Statistical measures for the association of ELISA IgM anti- <i>P. jirovecii</i> test results with the patient clinical diagnoses of PcP .....	124

## Capítulo 3

<b>Table 1.</b> ELISA protocols and conditions for detection of IgG and IgM anti- <i>P. jirovecii</i> antibodies reactive against the RSA produced .....	134
--	-----

## Capítulo 4

<b>Table 1.</b> Accuracy measures of the Kex1 RSA-based IgM ELISA for PcP diagnosis .....	153
---	-----

## **Anexos**

### **Anexo I**

<b>Supplementary table S1.</b> GOR IV secondary structure prediction of the RSA (NPS@: Network Protein Sequence Analysis) .....	195
--	-----



## Índice de Equações

<b>Equação 1 .....</b>	<b>59</b>
<b>Equação 2 .....</b>	<b>60</b>



## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

$\Delta\mu$  – Variação da mobilidade eletroforética

$\mu$  - Mobilidade eletroforética

**11-MUA** - Ácido 11-mercaptoundecanóico

**Abs** – Absorvância

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**AGE** – do inglês *Agarose Gel Electrophoresis*

**AN** – Aspirado nasal

**ARS** – Antigénio recombinante sintético

**AT** – Azul de toluidina

**AU** – do inglês *Absorbance Units*

**AUC** – Área abaixo da curva ROC (do inglês, *Area Under the ROC Curve*)

**AuNP** – Nanopartículas de ouro

**BAL** – do inglês *bronchoalveolar lavage*

**BSA** – Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

**CA15.3** - do inglês, *Cancer Antigen 15.3*

**CDC** – Centro de controlo e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)

**CHAPS** - 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamónia]-1-propanosulfonato

**DGAV** - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

**DLS** – do inglês *Dynamic Light Scattering*

**DNA** – do inglês *Deoxyribonucleic acid*

**DQ** - do inglês *Diff-Quick*

**DTT** – Ditioneitol

*E. coli* – *Escherichia coli*

**ECDC** – do inglês *European Center for Disease prevention and Control*

**EDC/NHS** - Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/N-hidroxissuccinimida

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)

**EE** – Expetoração Espontânea

**EGA** – Eletroforese em Gel de Agarose

**EI** – Expetoração Induzida

**ELISA** – do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*

**ELS** – do inglês *Electrophoretic Light Scattering*

**GAFFI** – do inglês *Global Action Fund for Fungal Infection*

**HIV** – do inglês *Human Immunodeficiency Vírus*

**IF/AcM** – Imunofluorescência com anticorpos monoclonais

**IFD** – Imunofluorescência direta

**IFI** – Imunofluorescência indireta

**IFI/AcM** – Imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais

**IF-MAb** - do inglês *immunofluorescence with monoclonal antibodies*

**Ig** - Imunoglobulina

**IgA** – Imunoglobulina A

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**IMAC** – do inglês *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*

**IPTG** – do inglês *isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*

**Kex1** – Protease de serina do tipo kexina 1 (do inglês, *Kexin-like serine protease 1*)

**KL-6** – do inglês *Krebs von den Lugen-6*

**LB** – Meio de cultura *Luria-Bertani*

**LBA** – Lavado broncoalveolar

**LDH** – Lactato desidrogenase (do inglês, *lactate dehydrogenase*)

**LFA** - do inglês *Lateral Flow Assay*

**LFIA** – do inglês *Lateral flow immunoassay*

**LO** – Lavado Oral

**LSPR** - do inglês *Localized Surface Plasmon Ressonance*

**MP** - Metenamina Prata

**Msg** – Glicoproteína *major* de superfície (do inglês, *Major surface glycoprotein*)

**MsgA** – Porção amino-terminal da glicoproteína *major* de superfície

**MsgB** – Porção intermédia da glicoproteína *major* de superfície

**MsgC** – Porção carboxilo-terminal da glicoproteína *major* de superfície

**mtLSUrRNA** – Subunidade grande do RNA ribossômico mitocondrial (do inglês, *mitochondrial large subunit ribosomal RNA*)

**NCBI** – do inglês *Nacional Center for Biotechnology Information*

**NM** – do inglês *Nitrocellulose Membrane*

**nPCR** – do inglês *Nested-Polimerase Chain Reaction*

**NTA** – do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*

**OD** – do inglês *Optical Densities*

**p** – Valor da estatística de teste

***P. jirovecii*** – *Pneumocystis jirovecii*

**PaO<sub>2</sub>** – Pressão parcial de oxigénio arterial

**PBS** – Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

**PBS-T** – Tampão fosfato salino suplementado com detergente *Tween* (do inglês, *Phosphate Buffered Saline with Tween*)

**PcP** – do inglês *Pneumocystis Pneumonia*

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

**pI** – Ponto Isoelétrico

**PIB** – Produto Interno Bruto

**PMSF** – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (do inglês, *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

**PPc** – Pneumonia por *Pneumocystis*

**PVA** – Álcool polivinílico (do inglês, *Polyvinyl alcohol*)

**RNA** – Ácido ribonucleico

**ROC** – Característica operacionais do recetor (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*)

**rpm** – Rotações por minuto

**rRNA** – RNA ribossómico (do inglês, *ribosomal ribonucleic acid*)

**RSA** – do inglês *Recombinant Synthetic Antigen*

**RT-qPCR** – PCR quantitativo em tempo real (do inglês, *Real-time quantitative PCR*)

**SAM** – S-adenosilmetionina

**SDS** – Dodecil-sulfato de sódio (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*)

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

**SIDA** – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

**SPSS** – Programa informático de análise estatística (do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*)

**T CD4<sup>+</sup>** - Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 4.

**T CD8<sup>+</sup>** - Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 8.

**TARVc** – Terapêutica anti retrovímica combinada

**Th** – Linfócitos T *helper*

**TMP-SMZ** – Trimetoprim-Sulfametoxazol

**Tris** – Tris(hidroximetilo)aminometano

**Tris-HCl** - Tris(hidroximetilo)aminometano-ácido clorídrico

**UV-Vis** - Ultravioleta-visível

**VIH** – Vírus da Imunodeficiência Humana

**WHO** – do inglês *World Health Organization*

# **Capítulo 1.**

## **Introdução Geral**





## 1.1 Pneumonia por *Pneumocystis*

*Pneumocystis* foi descoberto por Carlos Chagas, no Brasil, em inícios de século XX, tendo nessa altura sido considerado uma forma de desenvolvimento do ciclo de vida de *Tripanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Um ano depois, António Carini, também no Brasil, ao estudar o tecido do pulmão de ratos, reconheceu e identificou uma estrutura que parecia ser o mesmo microrganismo (Carini, 1910). Em 1912, no Instituto Pasteur em Paris, um estudo mais aprofundado sobre o material biológico proveniente das investigações de Carini, foi conduzido pelo casal Delanoë. Estes investigadores chegaram à conclusão de que o organismo em questão era claramente distinto de *T. cruzi* e, desde logo, atribuíram-lhe a designação de *Pneumocystis carinii*. Esta designação derivou do tropismo que o microrganismo apresentava para os pulmões (“*Pneumo*”), da sua forma quística típica (“*cystis*”) e de uma homenagem ao biólogo italiano António Carini (“*carinii*”), que havia proporcionado a investigação (Delanoë & Delanoë, 1912).

Contudo, só em meados do século XX, *Pneumocystis* começou a ser reconhecido como um agente patogénico importante para os humanos, causando epidemias de pneumonia intersticial em bebés prematuros e subnutridos na Europa (Gajdusek, 1957; Goldman, Goldman & Goldman, 2005). Entre as décadas de 60 e 70 do século passado, foi também relatado um crescimento da frequência deste microrganismo em imunocomprometidos, especialmente em doentes oncológicos submetidos a regimes quimioterapêuticos ou anti-inflamatórios intensivos. No entanto, foi somente no início dos anos 80 do mesmo século que a infeção por *Pneumocystis* alcançou proeminência, com a ocorrência de pneumonia por *Pneumocystis* em jovens adultos do sexo masculino seropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH), conduzindo ao reconhecimento inicial da epidemia da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) (CDC, 1982).

### 1.1.1 Espécies e taxonomia

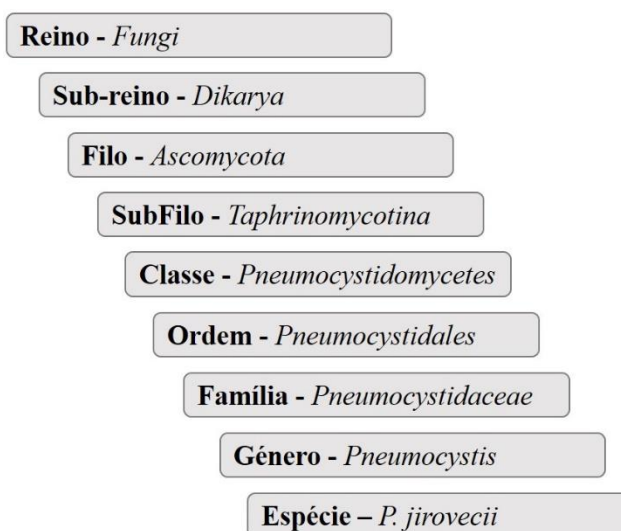
O género *Pneumocystis* inclui um grupo de organismos estreitamente relacionados, mas heterogéneos, que têm distribuição mundial. Este género tem sido encontrado em quase todas as espécies de mamíferos examinadas até ao momento, principalmente através de métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Contudo, apenas um número limitado de espécies de

*Pneumocystis* foram formalmente classificadas e denominadas de acordo com as regras do código internacional de nomenclatura botânica. Estas são: *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente designado *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*), causador de infecção em humanos e cuja nomenclatura homenageia o primeiro investigador a descrever a sua presença em humanos, Otto Jirovec (Frenkel, 1999); *Pneumocystis carinii*, causador de infecções em ratos e nomeado em homenagem a Antonio Carini (Frenkel, 1999); *Pneumocystis murina*, causador da infecção em murganhos (Keely *et al.*, 2004); *Pneumocystis wakefieldiae*, causador da infecção também em ratos e nomeado em homenagem a Ann Wakefield (Cushion, Keely & Stringer, 2004); e *Pneumocystis oryctolagi*, agente causador de infecção em coelhos (Dei-Cas *et al.*, 2006). Estas observações suportam a noção de que estes organismos são altamente omnipresentes e hospedeiro-específicos pois cada espécie de mamífero é infetada por, pelo menos, uma espécie de *Pneumocystis* específica.

Outra das particularidades que torna este microrganismo enigmático, é a sua classificação taxonómica, que tem passado por mudanças dramáticas desde da sua descoberta. Inicialmente, acreditava-se amplamente que *Pneumocystis* era um protozoário, tendo em conta as suas características morfológicas e sensibilidade a fármacos ativos contra protozoários. Em 1988, a análise do *locus* da sua subunidade 16S do rRNA (do inglês, *ribosomal ribonucleic acid*) surgiu como a primeira evidência científica de que *Pneumocystis* pertencia ao reino *Fungi* (Edman *et al.*, 1988). Este achado foi confirmado inequivocamente por todas as análises filogenéticas moleculares subsequentes (Redhead *et al.*, 2006). No entanto, desde então a sua posição taxonómica dentro do reino *Fungi* tem variado em diferentes estudos, dependendo dos *loci* seleccionados e das espécies de fungos envolvidas em cada um deles.

A maioria dos estudos baseados em conjuntos de dados de genes únicos e espécies fúngicas comuns colocam *Pneumocystis* no filo de *Ascomycota*, com *Schizosaccharomyces pombe* ou *Saccharomyces cerevisiae* como os parentes mais próximos (Edman *et al.*, 1988; Stringer *et al.*, 1989; Baldauf & Palmer., 1993; Fletcher *et al.*, 1994). Uma alteração da classificação taxonómica surgiu posteriormente com o crescente reconhecimento de uma linhagem *Ascomycota* divergente denominada *Archiascomycetes* (Nishida & Sugiyama, 1994) e posteriormente rebatizada de *Taphrinomycotina* (Eriksson & Winka, 1997), onde o género *Pneumocystis* foi inserido

(Figura 1). Ao longo das últimas décadas, análises filogenéticas crescentes baseadas em conjuntos de dados multi *locus* apoiam fortemente o agrupamento de *Pneumocystis* em *Taphrinomycotina* como um subfilo monofilético, onde as espécies que infetam roedores (*P. carinii* e *P. murina*) possuem proximidade filogenética mais forte entre si do que com a espécie que infeta os humanos (*P. jirovecii*) (Hibbett *et al.*, 2007; Cissé, Pagni & Hauser, 2012; Ma *et al.*, 2013; Ma, Cissé & Kovacs, 2018).



**Figura 1.** Classificação taxonômica atual abreviada da espécie de *Pneumocystis* que infeta o ser humano - *P. jirovecii* (adaptado de Redhead *et al.*, 2006).

Apesar da já inequívoca demonstração filogenética da sua posição taxonômica no reino dos fungos, *Pneumocystis* é considerado um fungo atípico devido às diferenças substanciais que apresenta relativamente aos membros do mesmo reino.

Após a sua reclassificação como fungo, foram feitos estudos para avaliar as atividades dos antifúngicos clássicos face a este microrganismo (Bartlett, Eichholtz & Smith, 1985; Bartlett *et al.*, 1994b; Cushion, Chen & Klopfer, 1997). Inesperadamente, *Pneumocystis* demonstrou ser resistente a estes fármacos, presumivelmente devido a não possuir o esterol característico das membranas celulares da maioria dos fungos (ergosterol) e, ao invés, conter quantidades elevadas de colesterol na sua membrana (Kaneshiro *et al.*, 1989; Bartlett *et al.*, 1994b, Matos *et al.*, 1999). Outra característica atípica importante de *Pneumocystis* é a morfologia pleomórfica e a fragilidade da parede celular da sua forma trófica, em contraste com a parede celular rígida da maioria dos fungos típicos. Análises genéticas mostraram a ausência de constituintes característicos das paredes celulares de

outros fungos em *Pneumocystis* o que o torna, presentemente, no único fungo que não possui quitina na sua parede celular (Ma *et al.*, 2016). Por outro lado, os conceitos de trofozoíto e quisto não são apropriados para descrever etapas do ciclo de vida de um fungo típico unicelular, mas são os conceitos mais comumente utilizados na descrição do ciclo de vida de *Pneumocystis* (Vavra & Kucena, 1970; Vossen *et al.*, 1978; Hasleton, Curry & Rankin, 1981; Matos *et al.*, 1999; Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

A nível genético, demonstrou-se que o rRNA de *Pneumocystis* é codificado por apenas um gene nuclear, ao contrário do que se verifica em outros fungos e na maioria dos eucariotas, que possuem centenas de cópias deste gene (Tang *et al.* 1998).

A quarta característica atípica de *Pneumocystis* é a sua incapacidade de crescer em meio de cultura *in vitro* de forma estável, duradoura e reprodutível, apesar dos extensos esforços feitos com meios de cultura próprios para fungos ou mesmo meios de cultura com células de mamíferos (Matos *et al.*, 1999; Schildgen *et al.*, 2014; Matos, Tomás & Antunes, 2017; Liu, Fahle & Kovacs, 2018). Uma explicação possível para esta dificuldade pode ser encontrada na demonstração de que, comparativamente a outros fungos, *Pneumocystis* apresenta um genoma altamente compacto, com a consequente perda de muitas vias metabólicas, o que potencialmente o torna altamente dependente do seu hospedeiro para complementar essas perdas (Cissé, Pagni & Hauser, 2012; Ma *et al.*, 2016).

Finalmente, outra característica única de *Pneumocystis* e que está relacionada com a sua dependência do hospedeiro, é a sua adaptação e possível coevolução com a espécie hospedeira. Como consequência, cada espécie de *Pneumocystis* parece capaz de infetar exclusivamente uma espécie hospedeira (Durand-Joly *et al.*, 2002), o que mais uma vez o distingue de muitos fungos patogénicos que podem ser detetados em diversos nichos ambientais e em diferentes espécies hospedeiras.

Em virtude do exposto, embora *Pneumocystis* tenha sido originalmente e durante muitos anos classificado como um protozoário, agora é inequivocamente reconhecido como um fungo na comunidade científica. Os seus aspetos controversos e enigmáticos, tornam este microrganismo fascinante e, ao mesmo tempo, difícil de estudar. Como a infeção causada no homem é provocada por *P. jirovecii*, seguir-se-á uma caracterização mais detalhada desta espécie.

### 1.1.2 Biologia de *Pneumocystis jirovecii*

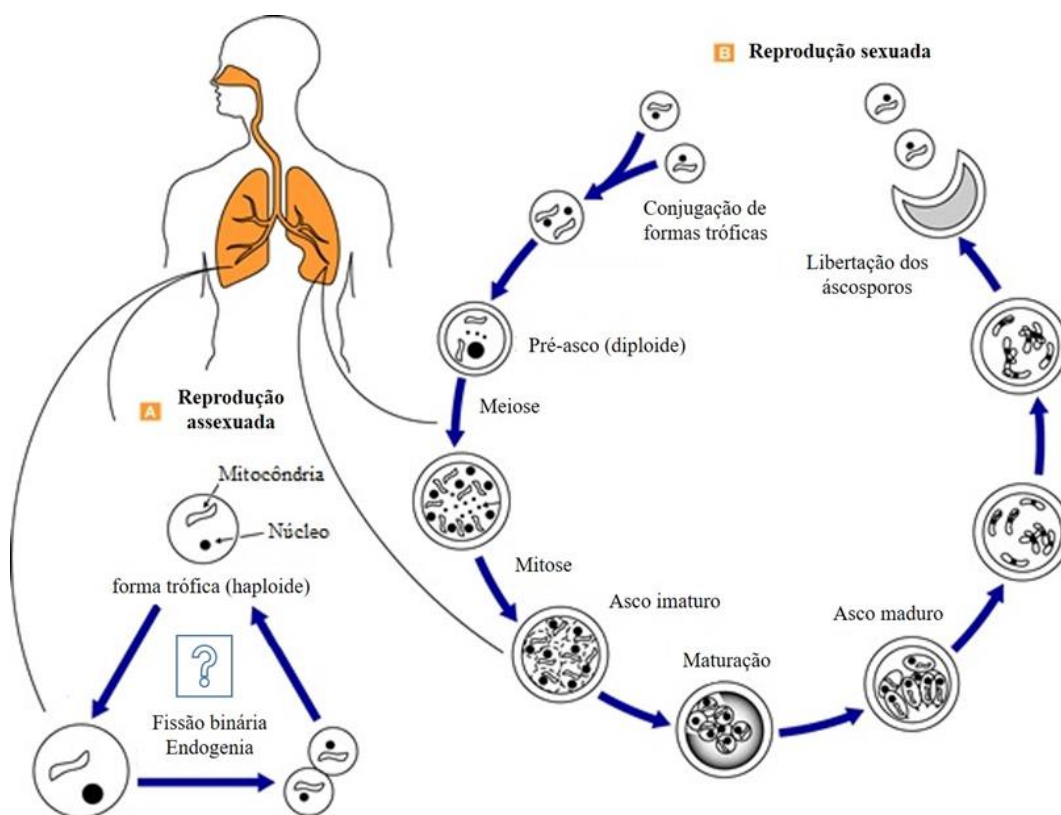
#### 1.1.2.1 Morfologia e ciclo de vida

Embora *Pneumocystis* tenha sido identificado há mais de 100 anos, o seu ciclo de vida permanece pouco compreendido, em grande parte devido à incapacidade de se cultivar o organismo continuamente *in vitro*.

Como parasitas extracelulares, *P. jirovecii* tem sido encontrado quase exclusivamente no espaço alveolar dos pulmões humanos. Aqui, o seu ciclo de vida putativo contempla fases de reprodução sexuada e assexuada, com duas formas de desenvolvimento principais identificadas durante a infecção, embora vários estádios intermediários tenham sido reconhecidos: a forma trófica, que é pleomórfica, com parede celular fina e flexível, haplóide e a forma de desenvolvimento mais abundante dos estádios do ciclo de vida (90% a 98% da população); e o asco (ou esporo, anteriormente designado forma quística), que existe tipicamente em baixa quantidade (2% a 10%) e que é arredondado, dotado de uma parede celular espessa e que contém no seu interior até oito células-filhas (os ascósporos) (Vavra & Kucena, 1970; Vossen *et al.*, 1978; Hasleton, Curry & Rankin, 1981; Aliouat-Denis *et al.*, 2009; Matos, Tomás & Antunes, 2017; Hauser & Cushion, 2018). Acredita-se que a forma trófica se reproduz assexuadamente por fissão binária, e talvez por endogenia, um processo reprodutivo que permanece pouco caracterizado e que foi relatado em apenas dois estudos (Vossen *et al.*, 1978; Yoshida, 1989). Por outro lado, a forma trófica evolue para asco através de uma fase sexuada do seu ciclo de vida (fase putativa, ainda não demonstrada). Duas formas tróficas haplóides unem-se dando origem a uma forma trófica diplóide, que entra em meiose seguida de mitose culminando na produção de oito ascósporos. Estes ascósporos são libertados após rutura do asco maduro, dando origem a novas formas tróficas, capazes de retomar o ciclo de vida (figura 2).

Apesar deste ciclo de vida ser ainda especulativo, estudos recentes vieram mostrar que a inibição da fase sexuada em modelos roedores (Cushion *et al.*, 2010), resulta na interrupção da transmissão da infecção e que na presença de bloqueio do ciclo sexuada, as formas tróficas adquirem preferencialmente uma forma de “latência” em vez de uma forma de replicação assexuada (Cushion *et al.*, 2010; Hauser & Cushion, 2018), sugerindo que a fase de reprodução sexuada não só é obrigatória, como necessária para a transmissão do fungo. Por outro lado, estes autores sugerem que o ciclo assexuado pode só ser ativado sob certas circunstâncias como a primoinfecção, devido à abundância de nutrientes, ou

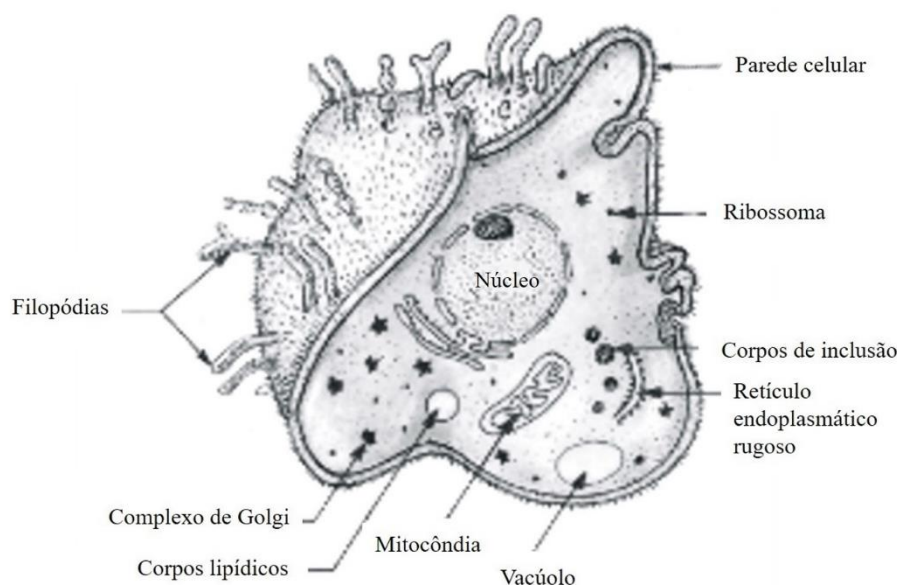
durante a colonização, devido a uma resposta imunitária fraca por parte do hospedeiro (Hauser & Cushion, 2018).



**Figura 2.** Representação esquemática do ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii* no alvéolo pulmonar. Estão propostas fases de reprodução assexuada (A), cujo processo ainda não foi esclarecido completamente, e de reprodução sexual (fase putativa) (B) deste organismo (imagem adaptada de CDC, 2019).

Nos indivíduos infetados, as formas tróficas encontram-se frequentemente agrupadas ou firmemente ligadas a pneumócitos do tipo I dos alvéolos pulmonares, sendo facilmente identificadas devido à sua forma pleomórfica. As suas dimensões variam aproximadamente entre 2 a 10 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diâmetro, apresentando uma parede celular fina e flexível (com cerca de 20 a 30 nanómetros [nm] de espessura) e cada forma trófica contém um único núcleo, que é circundado por organelos citoplasmáticos (mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e liso, vesículas de Golgi e vacúolos citoplasmáticos) (Vossen *et al.*, 1978; Yoshikawa, Morioka & Yoshida, 1987). Na

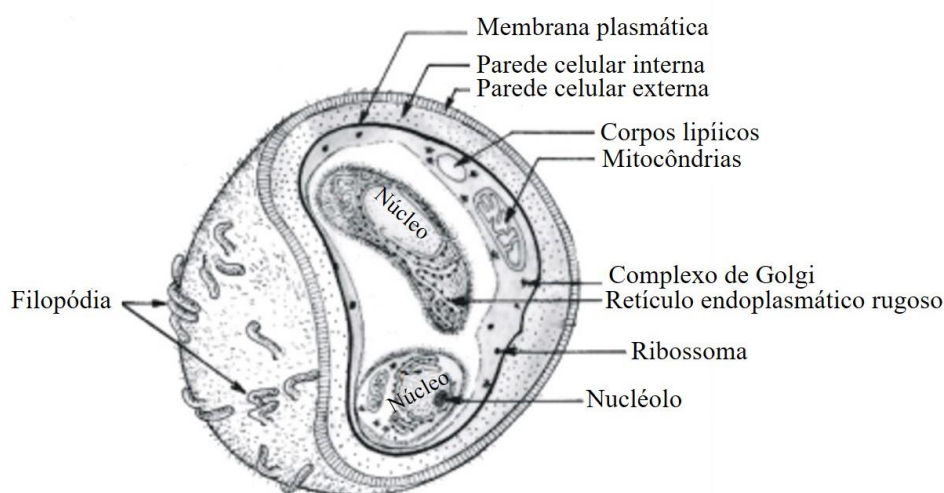
superfície da forma trófica, existem muitas protuberâncias, denominadas extensões tubulares ou filopódias, que muitas vezes se projetam em direção à célula hospedeira ou penetram nas invaginações da célula hospedeira (Vavra & Kucena, 1970; Vossen *et al.*, 1978; Yoshikawa, Morioka & Yoshida, 1987; Yoshida, 1989; Matos *et al.*, 1999). As suas funções permanecem desconhecidas, mas tem sido proposto que possam ser importantes na fixação, nutrição e locomoção do organismo (Vavra & Kucena, 1970; Henshaw, Carson & Collier, 1985; Aliouat-Denis *et al.*, 2009). Uma representação estrutural da forma trófica está presente na figura 3.



**Figura 3.** Representação esquemática das principais estruturas da forma trófica de uma célula de *P. jirovecii* (adaptado de Matos *et al.*, 1999 e de Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Após a inalação, os ascos são presumivelmente depositados nos alvéolos pulmonares do hospedeiro. Estas formas são facilmente identificáveis devido à sua morfologia esférica (aproximadamente com 5 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e à sua parede celular espessa e lisa (com cerca de 100 a 160 nm de espessura) (Vavra & Kucera 1970; Yoshida, 1989; Matos *et al.*, 1999). A porção interna do asco, possui uma matriz constituída por mitocôndrias, ribossomas, vacúolos vazios e restos de membrana. Quando maduros, os ascos possuem oito ascósporos (designados anteriormente corpos intraquísticos) no seu interior, que possuem formas esféricas ou elipsoides alongadas (1-2  $\mu\text{m}$  de diâmetro), com um núcleo localizado centralmente. A parede celular dos ascos forma uma espécie

de fenda, que se pensa poder estar relacionada com o fenômeno de libertação destes ascósporos, pois nesta zona localiza-se uma estrutura semelhante a um orifício, cuja função e o processo de diferenciação não são conhecidos (Ruffolo, Cushion & Walzer, 1989). Também ainda não está claro o porquê e qual a importância destas diferenças estruturais dos ascósporos, embora alguns autores sugiram que a forma alongada poderá representar uma estrutura de latência do parasita, adaptada para a transmissão entre hospedeiros (Vavra & Kucera, 1970). Uma representação estrutural dos ascos de *P. jirovecii* está presente na figura 4.



**Figura 4.** Representação esquemática das principais estruturas dos ascos de *P. jirovecii* (adaptado de Matos *et al.*, 1999 e de Matos, Tomás & Antunes, 2017).

A evolução de *Pneumocystis* fora do hospedeiro mantém-se desconhecida, como tal, não se conhecem fases do ciclo de vida no ambiente.

### 1.1.2.2 Transmissão

Atualmente, ainda não está definida claramente a via de transmissão de *P. jirovecii*. No entanto, estudos de biologia molecular em *Pneumocystis* têm permitido avanços no entendimento das seguintes questões básicas: qual o reservatório, qual a forma infecciosa e como se transmite a infecção por *Pneumocystis*?

No que respeita à questão “qual o reservatório de *Pneumocystis*?”, inicialmente punha-se a hipótese de a infecção por *Pneumocystis spp.* ser uma zoonose, em grande parte



devido à semelhança morfológica entre as espécies de *Pneumocystis* e devido à sua ampla distribuição entre os mamíferos (Kucera, 1967). No entanto, relatos crescentes da incapacidade de transmitir experimentalmente *Pneumocystis* entre várias espécies de mamíferos (Gigliotti *et al.*, 1993; Aliouat *et al.*, 1994; Atzori *et al.*, 1999; Durand-Joly *et al.*, 2002), bem como a descoberta de diferenças genéticas significativas entre os organismos de *Pneumocystis* de diferentes espécies animais (Sinclair *et al.*, 1991; Weinberg & Durant, 1994), levaram ao reconhecimento de que *Pneumocystis* é espécie-específico.

A teoria seguinte baseou-se na procura de reservatórios ambientais. Esta questão foi abordada em diversos estudos, a maioria dos quais realizados em amostras de ar. Nestes estudos, foi detetada a presença de ADN do fungo em amostras de ar proveniente de instalações que alojavam animais infetados por *Pneumocystis* (Bartlett *et al.*, 1994a; Olsson *et al.*, 1996; Wakefield, 1996; Latouche *et al.*, 1997; Philippe *et al.*, 1999; Menotii *et al.*, 2003), tendo mesmo alguns autores chegado a demonstrar que os genótipos presentes nas amostras de ar eram idênticos aos presentes nos pulmões dos animais infetados (Latouche *et al.*, 1997; Philippe *et al.*, 1999). Adicionalmente, surgiram relatos da deteção de ADN de *P. jirovecii* no ar de residências e quartos hospitalares que acomodavam doentes com PPc, onde os genótipos provenientes das amostras de ar apresentavam semelhança com os provenientes dos pulmões dos doentes da mesma sala (Olsson *et al.*, 1996; Bartlett *et al.*, 1997; Damiani *et al.*, 2012; Fréalle *et al.*, 2017). Igualmente, o registo de pequenos surtos epidémicos de PPc em doentes internados em hospitais, assim como a relativa facilidade com que se encontra descrita colonização por *Pneumocystis* em animais, profissionais de saúde e outros humanos saudáveis (Singer *et al.* 1975; Fenelon *et al.* 1985; Goesch *et al.* 1990; Olsson *et al.* 1996; Bartlett *et al.* 1997; Wakefield *et al.*, 2003; Rabodonirina *et al.*, 2004; Medrano *et al.*, 2005; Gianella *et al.*, 2010; Morris & Norris, 2012), põem em evidência a possibilidade de existência de organismos de *Pneumocystis* viáveis no ar, assim como a possibilidade do próprio hospedeiro servir de reservatório e fonte de propagação da infeção. Apesar de esta ser a teoria mais aceite atualmente, a sua confirmação carece ainda da identificação de organismos intactos e viáveis no ar, o que se tem demonstrado um desafio, devido à baixa carga fúngica do organismo no ar e à incapacidade de cultivar *Pneumocystis in vitro*.

Relativamente à questão “qual a forma infetante de *P. jirovecii*?”, análises recentes do genoma de *Pneumocystis* têm demonstrado que este fungo evoluiu como parasita obrigatório, o qual depende do pulmão do hospedeiro para fornecimento estável de gás e nutrientes, e para a sua proteção contra agentes de *stress* como variações de pH, temperatura ou pressão osmótica (Hauser *et al.*, 2010; Cissé, Pagni & Hauser, 2014; Ma *et al.*, 2016). Como a forma trófica parece ser incapaz de sobreviver num ambiente hostil, fora do pulmão humano, os ascos com a sua parede celular rígida têm sido apontados como a forma infetante mais provável de *Pneumocystis*. Esta teoria recebeu reforço, recentemente, com o desenvolvimento de estudos de inibição da produção do maior constituinte da parede celular dos ascos, o  $\beta$ -1,3-D-glucano (doravante designado  $\beta$ -glucano), em ratos e murganhos imunocomprometidos (Cushion *et al.*, 2010). Neste estudo, os animais que sofreram tratamento com o inibidor, somente possuíam formas tróficas nos seus pulmões, não sendo capazes de transmitir a infeção a outros animais. Por outro lado, animais infetados por *Pneumocystis* que não foram submetidos ao tratamento de inibição, mostraram capacidade de transmitir a infeção. Estes factos apoiam fortemente a hipótese de os ascos serem a forma infecciosa desta patologia, apresentando capacidade de sobrevivência no ar exterior, pelo menos transitoriamente ou num estado de dormência, após a sua expiração pelo hospedeiro infetado.

Existe, portanto, evidência de que a infeção é adquirida por inalação de ascos e que a via aérea é a principal forma de transmissão. No entanto, a pergunta “como é feita esta transmissão?” permanece sem resposta. Em vez disso, questões específicas vão surgindo: a transmissão é feita diretamente de hospedeiro para hospedeiro ou envolve um reservatório ambiental? A infeção é fruto da reativação de uma infeção latente no alvéolo pulmonar, ou de uma infeção de novo?

Já se discutiu que é provável que este agente seja transmitido através da sua disseminação por via aérea pelos hospedeiros infetados. No entanto, a sua viabilidade no meio exterior ainda não foi demonstrada. Dados revelam que a carga de *P. jirovecii* nas amostras de ar diminui à medida que a distância dos doentes com PPc aumenta (Choukri *et al.*, 2010), sugerindo que o contacto próximo pessoa a pessoa pode facilitar a transmissão. No entanto, a existência de reservatórios ambientais de *P. jirovecii* não está colocada de parte, aceitando-se que este microrganismo se encontre distribuído pelo ambiente.

A evidência de que, uma vez adquirido, *P. jirovecii* pode manter-se no pulmão do hospedeiro imunocompetente sem causar sintomatologia, uma vez que o sistema imunológico intacto controla com sucesso a infecção clínica sem eliminar o microrganismo (Nevez *et al.* 1997; Sing *et al.* 1999; Chabé *et al.* 2004), conduziu a que se considerasse que os casos de PPc seriam resultado da reativação de uma infecção latente no alvéolo pulmonar. Outras evidências epidemiológicas a favor desta teoria incluem a alta prevalência de anticorpos anti-*Pneumocystis* em crianças saudáveis no início de vida (Peglow *et al.*, 1990; Wakefield *et al.*, 1990a), a alta prevalência de colonização por *Pneumocystis* em recém-nascidos (Beard *et al.*, 2005) e a alta prevalência de PPc em crianças imunocomprometidas (Simonds *et al.*, 1995; Goldman, Goldman & Goldman, 2005). Contudo, outros estudos suportam a ideia de que *P. jirovecii* pode ser adquirido de novo, contrariando a teoria da infecção latente como principal mecanismo de infecção. A presença de ADN de *Pneumocystis* em amostras de ar (Olsson *et al.*, 1996; Bartlett *et al.*, 1997; Damiani *et al.*, 2012; Fréalle *et al.*, 2017), a demonstração de transmissão animal a animal sob condições controladas (Cushion *et al.*, 2010) e a ocorrência de surtos nosocomiais ou geográficos de PPc em doentes imunocomprometidos (Dohn *et al.*, 2000; Rabodonirina *et al.*, 2004; Gianella *et al.*, 2010; de Boer, de Fijter & Kroon, 2011), são algumas das evidências que apoiam a possibilidade de aquisição de uma infecção de novo. No entanto, é difícil diferenciar esses dois mecanismos simplesmente com base em dados epidemiológicos. Estudos mais recentes de biologia molecular têm apoiado a teoria de infecção recente com a demonstração de diferentes genótipos entre o primeiro e o segundo episódios de PPc em doentes com infecção recorrente (Keely *et al.*, 1995; Keely *et al.*, 1996; Tsolaki *et al.*, 1996); surtos de PPc causados por uma única estirpe dentro de um ou mais centros de transplantes de órgãos (Sassi *et al.*, 2012; Mulpuru *et al.*, 2016; Vindrios *et al.*, 2017); e a ocorrência de mutações associadas à resistência a fármacos em doentes sem exposição prévia a esses fármacos (Ma *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Matos & Esteves, 2010; Ponce *et al.*, 2017). Contudo, também existem resultados de estudos de genotipagem a fornecer evidências a favor da reativação da infecção latente, ao demonstrarem a presença dos mesmos genótipos entre o primeiro e segundo episódios em doentes com infecção recorrente (Tsolaki *et al.*, 1996) ou a alta diversidade de genótipos entre diferentes doentes (Ripamonti *et al.*, 2009). Estes achados, juntamente com o alto nível de adaptação ao ambiente pulmonar e especificidade estrita de hospedeiro por parte

de *P. jirovecii*, sugerem possível colonização e persistência em estado latente do microrganismo nos pulmões do hospedeiro.

Assim, embora existam, em alguns casos, fortes evidências de aquisição recente, a reativação em outros casos não pode ser excluída. Pelo que, atualmente é assumido que ambos os mecanismos possam ocorrer.

### 1.1.3 Fisiopatologia da infecção por *Pneumocystis jirovecii*

A patogénese da pneumonia por *Pneumocystis* pode ser dividida em quatro fases: estabelecimento da infecção, proliferação do microrganismo, alterações no microambiente alveolar e resposta imunitária do hospedeiro (Walzer, 1994; Thomas & Limper, 2004).

*P. jirovecii* é um fungo que exibe tropismo altamente definido para os pulmões humanos, produzindo infecção como agente extracelular no espaço alveolar (Gigliotti & Wright, 2005; Thomas & Limper, 2004). Assim, a infecção começa por se estabelecer com a ligação preferencial das formas tróficas aos pneumócitos do tipo I e, em menor grau, aos pneumócitos do tipo II dos alvéolos pulmonares, através da interdigitação das suas membranas celulares com as das células hospedeiras (Gigliotti & Wright, 2005; Skalski, Kottom & Limper, 2015). Esta interação, conduz ao aumento da proliferação de *Pneumocystis* e, ao mesmo tempo, à inibição do crescimento das células epiteliais alveolares (Limper & Martin, 1990; Limper *et al.*, 1998; Skalski, Kottom & Limper, 2015). Consequentemente, à medida que a infecção evolui, o microambiente alveolar fica marcado por danos pulmonares mediados direta e indiretamente por *Pneumocystis* (Wright & Gigliotti, 2005). Embora os mecanismos de lesão direta não sejam claros, estudos indicam que a libertação de várias enzimas proteolíticas e glicolíticas pelo microrganismo possam estar na origem dos danos colaterais no pulmão do hospedeiro (Hayes *et al.*, 1991; Breite, Bailey & Martin, 1993; Sukura *et al.*, 1995; Atzori *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2000; Fox & Smulian, 2001; Kutty & Kovacs, 2003). Por sua vez, os danos indiretos são fruto da resposta imunitária do hospedeiro. Esta resposta, apesar de necessária para o controlo da infecção, pode causar ou exacerbar os sintomas da doença. Por exemplo, doentes com maior competência imunológica, acabam por controlar melhor a carga fúngica de *Pneumocystis*, mas por sofrer lesões inflamatórias maiores do que os doentes imunocomprometidos. Naturalmente, doentes com imunossupressão mais grave acabam por sofrer menos complicações inflamatórias, mas ficam mais suscetíveis a

efeitos diretos de cargas mais elevadas do microrganismo (Limper *et al.*, 1989; Gigliotti & Wright, 2005; Gigliotti, Limper & Wright, 2014).

### **1.1.3.1 Resposta imunitária do hospedeiro à infecção por *Pneumocystis jirovecii***

Como *P. jirovecii* tem tropismo para o espaço alveolar dos pulmões humanos, as células responsáveis pela imunidade inata local, são a primeira linha de defesa do hospedeiro para controlar o microrganismo e prevenir a infecção. Aqui, podemos contar com a atuação dos macrófagos alveolares, das células dendríticas, dos neutrófilos e das células epiteliais pulmonares (Kelly & Shellito, 2010; Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Os macrófagos alveolares, como células fagocíticas, reconhecem padrões moleculares dos agentes patogénicos localizados à superfície dos microrganismos através de recetores de reconhecimento. Entre estes recetores, o recetor da manose é um dos mais importantes, pois é capaz de reconhecer a glicoproteína major de superfície de *Pneumocystis* (Msg, do inglês *major surface glycoprotein*), a qual é a proteína de superfície de *P. jirovecii* mais abundante. Os recetores do  $\beta$ -glucano, são outra classe de recetores muito importante, na medida em que fazem o reconhecimento deste componente que está presente na parede celular dos ascos de *Pneumocystis* em grande abundância (Ezekowitz, *et al.*, 1991; Steele *et al.*, 2003; Brown & Gordon, 2005; Kelly & Shellito, 2010; Matos, Tomás & Antunes, 2017). A interação destes recetores com os respetivos antígenos de superfície do microrganismo, conduz à ativação do macrófago com subsequente fagocitose e destruição do agente patogénico. A pressão oxidativa dos macrófagos, a libertação de óxido nítrico e de intermediários reativos de azoto, têm mostrado ser os principais mecanismos responsáveis pela destruição de *P. jirovecii* no interior do fagócito (Hidalgo *et al.*, 1992; Laursen *et al.*, 1994; Limper, Hoyle & Standing, 1997; Steele *et al.*, 2003). Além disso, a ativação destas células conduz à produção de uma ampla variedade de mediadores pró-inflamatórios que, além de auxiliarem na erradicação do microrganismo pelo hospedeiro e na ativação do sistema imunológico adaptativo, também promovem respostas inflamatórias que levam à lesão pulmonar (Limper, Hoyle & Standing, 1997). O papel fulcral destes fagócitos no controlo da infecção é suportado por diversos estudos que mostram uma correlação inversa entre o número de macrófagos alveolares e a progressão da doença (Fleury *et al.*, 1985; Young *et al.*, 1985; Young *et al.*, 1986; Limper, Hoyle & Standing, 1997).

Além dos macrófagos locais, também as células dendríticas são importantes células imunitárias efetoras no pulmão. Situadas no epitélio das vias aéreas, nos septos alveolares e ao redor dos vasos sanguíneos pulmonares, estas células são rápidas a responder aos antígenos inalados. Como células apresentadoras de antígenos, quando ativadas produzem citocinas e migram para os gânglios linfáticos, onde ativam a resposta das células T aos antígenos (Kelly & Shellito, 2010).

Também os neutrófilos estão associados ao processo inflamatório e têm sido relacionados com uma progressão mais grave da doença. De facto, a inflamação e a diminuição da função pulmonar, causadas por *Pneumocystis* em indivíduos seropositivos para VIH, foram correlacionadas com contagens altas de neutrófilos (Jensen *et al.*, 1991; Sadaghdar, Huang & Eder, 1992).

Por fim, as células epiteliais do pulmão são também fundamentais na patogénese da infeção por *Pneumocystis*, uma vez que os pneumócitos do tipo I são as células de eleição para a adesão do microrganismo. A ligação do microrganismo a estas células é facilitada pela presença de fibronectina e vitronectina, glicoproteínas presentes na matriz extracelular das células do hospedeiro, as quais se ligam à superfície das células de *Pneumocystis*, permitindo a invaginação das membranas celulares deste microrganismo no epitélio alveolar (Pottratz & Martin, 1990; Pottratz *et al.*, 1991; Limper *et al.*, 1993). Como todas as células epiteliais, os pneumócitos são capazes de secretar citocinas inflamatórias e quimiocinas, em resposta ao *stress* causado pelo agente patogénico, ajudando a despoletar uma resposta imunitária adaptativa.

Quando a imunidade adaptativa é ativada, as células T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel central, estando tal bem esclarecido através de fortes correlações entre a diminuição do número destas células e o risco aumentado de desenvolvimento de PPc (Phair *et al.*, 1990; Mansharamani *et al.*, 2000). Contudo, os mecanismos pelos quais estas células contribuem para a eliminação do agente patogénico, não se encontram tão bem esclarecidos. Estudos em modelos animais com imunodeficiência severa combinada, demonstraram que estas células desempenham um papel fulcral no recrutamento e ativação de células efetoras responsáveis pela eliminação do microrganismo. Na ausência de células T CD4<sup>+</sup>, os modelos animais desenvolveram infeção grave por *Pneumocystis* apesar da presença de neutrófilos e macrófagos pulmonares funcionais (Roths *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1999). Porém, quando reconstituídos com células T CD4<sup>+</sup>, os animais foram

capazes de recuperar, eliminando a infecção, o que indica que a ativação das células efetoras mediada por células T CD4<sup>+</sup> é necessária para a defesa efetiva do hospedeiro contra *Pneumocystis* (Harmsen & Stankiewicz, 1990; Beck & Harmsen, 1998). Contudo, a subpopulação específica de células T CD4<sup>+</sup> necessária à resolução da infecção permanece por esclarecer, pois o recrutamento pulmonar de ambas as populações Th1 e Th2 (do inglês, *t helper* 1 e 2) são descritas pelos autores após infecção experimental com *Pneumocystis* em modelos animais (Shellito *et al.*, 2000; Shipley *et al.*, 2010).

No que respeita às células T CD8<sup>+</sup>, sabe-se que funcionam em conjunto com as células T CD4<sup>+</sup> numa resposta imunitária normal, eficaz contra a infecção por *Pneumocystis*. No entanto, tem havido muito debate sobre se o seu envolvimento é protetor ou prejudicial, particularmente nas situações de deficiência de células T CD4<sup>+</sup>. Estudos em modelos animais demonstraram que animais desprovidos de células T CD4<sup>+</sup>, apresentavam um influxo de células T CD8<sup>+</sup> no pulmão em resposta à infecção por *Pneumocystis*. Contudo, este influxo não é suficiente para o controlo da infecção (Beck *et al.*, 1991). Animais desprovidos de ambos os tipos de células T (CD4 e CD8), apresentaram uma carga fúngica maior nos pulmões do que aqueles que eram capazes de produzir células T CD8<sup>+</sup>, sugerindo que estas células de algum modo têm um papel de proteção parcial contra *Pneumocystis* no contexto de deficiência ou disfunção das células T CD4<sup>+</sup> (Beck *et al.*, 1996).

Embora o maior fator de risco para o desenvolvimento da PPc seja a falta de imunidade relacionada com as células T, estudos em modelos experimentais com deficiências na produção ou número de células B vieram mostrar que estas células também desempenham um papel no combate a este microrganismo (Marcotte *et al.*, 1996; Lund *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2006; Hugle *et al.*, 2010; Kurokawa, Kaya & Yoshida, 2010). A principal dúvida quanto à proteção mediada pelas células B é se ela tem origem na produção de anticorpos específicos anti-*Pneumocystis*, ou se tem origem na ativação das células T CD4<sup>+</sup> por estas células.

A descrição de casos de PPc em doentes com mutações genéticas que afetam a produção de imunoglobulinas (Milledge *et al.*, 2003), juntamente com relatos de seropositividade elevada para *P. jirovecii* em indivíduos saudáveis com infecção assintomática por este microrganismo (Morris & Norris, 2012), assim como de seroprevalência de anticorpos IgM e IgG anti-*P. jirovecii* em imunocomprometidos com

infecção ativa ou passada por *P. jirovecii* (Daly *et al.*, 2002; Bishop & Kovacs, 2003; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009; Tipirneni *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Djawe *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011; Blount *et al.*, 2012; Djawe *et al.*, 2013; Tomás *et al.*, 2016; Tomás *et al.*, 2019), fornecem forte evidência de que a imunidade humoral é um componente crítico da imunidade protetora contra este agente patogénico. Por outro lado, estudos demonstraram que modelos animais com imunodeficiência severa combinada tratados com células T CD4<sup>+</sup> provenientes de animais desprovidos de células B funcionais (Lund *et al.*, 2006) não foram capazes de controlar eficazmente a infeção por *Pneumocystis*. Em conjunto, estes dados mostram que os anticorpos desempenham um papel crucial no controlo da infeção, mas também indicam que a interação das células B com as células T CD4<sup>+</sup> é necessária para a eliminação do microrganismo dos pulmões.

Além de todos os intervenientes de imunidade celular, várias citocinas e quimiocinas, libertadas por todas as células nucleadas, participam também na resposta do hospedeiro e fornecem um mecanismo de comunicação intercelular que não é dependente de contacto (Thomas & Limper, 2004; Kelly & Shelitto, 2010; Matos, Tomás & Antunes, 2017). Elas participam na manutenção de um equilíbrio crucial entre a eliminação das células de *Pneumocystis* e a modulação da resposta inflamatória a este agente patogénico.

Estes factos mostram que a resposta imunitária à infeção por *Pneumocystis* depende de uma interação dinâmica entre quase todos os elementos do sistema imunológico. A imunidade celular inata é fundamental no reconhecimento inicial do agente patogénico, que resulta na eliminação do mesmo e na ativação da resposta adaptativa. A imunidade adaptativa, por sua vez, é crucial na amplificação da resposta celular inata, no controlo da infeção e na criação de memória imunológica contra o fungo invasor.

### **1.1.3.2 Mecanismos de evasão à resposta imunitária do hospedeiro**

Avanços recentes em tecnologias de biologia molecular, permitiram sequenciar o genoma de *P. jirovecii* (Cissé, Pagni & Hauser, 2012; Ma *et al.*, 2016). Estes conhecimentos aliados à perceção de que *P. jirovecii* evoluiu de forma a habitar os alvéolos pulmonares do hospedeiro durante longos períodos de tempo, conduziu a descobertas relativas ao mecanismo de variação antigénica de *Pneumocystis*.

A superfície da parede celular quer da forma trófica quer dos ascos de *Pneumocystis* é constituída por uma glicoproteína de superfície principal (Msg), codificada por uma



família de oito genes multi-cópia, com um número estimado de 1 a 80 cópias por genoma (Ma *et al.*, 2016; Hauser, 2019). Estes genes encontram-se agrupados em conjuntos, nos telómeros dos cromossomas de *P. jirovecii* (Keely *et al.*, 2005; Stringer, 2007; Keely & Stringer, 2009; Hauser, 2019). Esta sua localização pode ser estratégica, na medida em que estas regiões cromossómicas são mais propensas ao silenciamento de genes, à ocorrência de mutagenese e ao favorecimento de recombinações ectópicas, que culminam na criação de antígenos em mosaico (Barry *et al.*, 2003; Deitsch, Lukehart & Stringer, 2009; Hauser, 2019). O que se sabe realmente é que graças a esta família de genes, *Pneumocystis* é capaz de expressar células com antígenos de superfície diferentes entre si, no mesmo momento da infeção, o que permite a fuga à imunidade do hospedeiro durante a colonização (Hauser, 2019). Os estímulos que conduzem a este fenómeno não foram, até ao momento, esclarecidos. Contudo, esta variação parece ocorrer através de um mecanismo de regulação da transcrição e de um rearranjo genómico complexo, que resulta numa expressão de variantes mosaico da família de genes da *Msg* (Stringer & Keely, 2001). Alguns autores chegam a acreditar que aproximadamente 5% do genoma de *Pneumocystis*, está somente dedicado a este mecanismo de evasão (Hauser, 2019).

Esta estratégia de variação antigénica é substancialmente diferente da apresentada por outros agentes patogénicos cujo local de infeção é estéril, como é o caso de *Plasmodium spp.* ou *Trypanosoma cruzi*, que são parasitas sanguíneos. Estes microrganismos, devido à forte reação imunológica dirigida a qualquer agente externo que rompa a esterilidade do sangue, adotam a estratégia de produzir populações de células com antígenos homogéneos entre si, provocando uma mudança na isoforma desses antígenos, quando são reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. No caso de *Pneumocystis*, uma vez que é comum a entrada de bactérias e esporos fúngicos nos pulmões humanos durante a respiração, o sistema imunológico do hospedeiro é mais tolerante a baixas cargas fúngicas. Assim, *Pneumocystis* ao apresentar a maioria das suas células com uma composição antigénica diferente, mimetiza uma baixa abundância das suas células. Este mecanismo é extremamente importante no estabelecimento da infeção e em eventos de colonização dos pulmões do hospedeiro, uma vez que ilude a perceção do sistema imunológico do hospedeiro relativamente à carga fúngica de *Pneumocystis*, permitindo a sua presença e proliferação (Hauser, 2019).

### 1.1.4 Manifestações clínicas da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

Dada a afinidade deste microrganismo para as células epiteliais (pneumócitos) do tipo I dos alvéolos pulmonares humanos, as manifestações pulmonares são as mais frequentes e comuns numa infecção causada por este agente. No hospedeiro imunocompetente, o controlo da infecção é a regra, não havendo consequências clínicas. Contudo, quando o sistema imunológico se encontra fragilizado, a probabilidade deste microrganismo se tornar ativo e se desenvolver em grande quantidade é aumentada. Assim, à medida que a infecção evolui, o espaço alveolar começa a ser preenchido por células epiteliais lesadas ou hipertrofiadas, por um exsudato que preenche os alvéolos uniformemente e por formas de desenvolvimento de *Pneumocystis* (Walzer, 1994). Este processo conduz à hipoxemia e possivelmente a uma insuficiência respiratória capaz de originar a morte do hospedeiro imunocomprometido (Moe & Hardy, 1994; Thomas & Limper, 1998; Thomas & Limper, 2004; Calderón *et al.*, 2010; Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Os sintomas da pneumocistose são geralmente febre (38°C a 40°C), dispneia e tosse regra geral não produtiva ou com a produção de pequenas quantidades de expectoração (Barry & Johnson, 2001). No entanto, os sintomas diferem muito de doente para doente, consoante o seu historial clínico. Nos seropositivos para VIH, as manifestações mais comuns têm início subagudo com dispneia progressiva, aumento variável da temperatura corporal, tosse não produtiva e evidência de desconforto respiratório, que se prolongam por semanas. Para estes doentes, a PPC é muitas vezes a doença definidora de sida, pois ocorre normalmente quando a contagem de células T CD4<sup>+</sup> diminui para níveis inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup> de sangue. (Huang, 2005; Calderón *et al.*, 2010; Matos, Tomás & Antunes, 2017). Nos doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH, os sintomas surgem de forma mais abrupta, podendo progredir rapidamente para a insuficiência respiratória, apesar da carga fúngica presente nos pulmões destes doentes ser, por norma, inferior à verificada em doentes com sida (Kovacs *et al.*, 1984; Hughes, 2005; Matos, Tomás & Antunes, 2017).

As alterações dos exames auxiliares de diagnóstico associadas a esta patologia são, normalmente, o aumento da lactato desidrogenase (LDH, do inglês *lactate dehydrogenase*) para níveis superiores a 500 mg/dL (Smith *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1988; Matos, Tomás & Antunes, 2017); alteração da radiografia do tórax com a presença de infiltrados intersticiais bilaterais simétricos e difusos (Selwyn *et al.*, 1998; Matos,

Tomás & Antunes, 2017); e alteração da gasimetria arterial, com diminuição da pressão parcial do oxigénio (PaO<sub>2</sub>) para níveis inferiores a 65 milímetros de mercúrio (mmHg), provocada pela dificuldade nas trocas gasosas (Barry & Johnson, 2001; Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Apesar dos sintomas e das alterações dos exames auxiliares de diagnóstico serem sugestivos da presença de infeção por *Pneumocystis*, não são patognomónicos da PPc, pelo que a avaliação clínica fornece somente um diagnóstico presuntivo desta patologia.

Além da infeção pulmonar característica, a presença de *P. jirovecii* tem vindo a ser descrita noutros órgãos e tecidos, em doentes imunocomprometidos. Estas manifestações são raras e normalmente concomitantes com localização pulmonar do microrganismo, o que sugere disseminação sistémica a partir do pulmão em doentes que apresentam um estado de imunossupressão muito grave, sem profilaxia ou com profilaxia com pentamidina (Raviglione, 1990; Ng, Yajko & Hadley, 1997; Hof, 2012).

### **1.1.5 Dados epidemiológicos e importância clínica da infeção por *Pneumocystis jirovecii* na saúde pública mundial**

Em 2017, o *Global Action Fund for Fungal Infection* (GAFFI) reuniu uma lista de doenças fúngicas que são de importância prioritária para a saúde pública global (GAFFI, 2017). Neste relatório, a pneumonia por *Pneumocystis* surge como a segunda infeção fúngica invasiva mais frequente com elevado índice de mortalidade associado, prevendo-se que a prevalência global desta patologia seja superior a 400.000 casos anuais em todo o mundo (Brown *et al.*, 2012; Armstrong, Meintjes & Brown, 2014; Bongomin *et al.*, 2017).

Nos países industrializados a implementação generalizada da quimioprofilaxia contra *Pneumocystis* e da terapêutica anti retroviral combinada (TARVc), durante as últimas três décadas, provocou diminuição acentuada na incidência da PPc nos doentes infetados por VIH (Miller, Huang & Walzer, 2013). Contudo, esta patologia continua a ser a doença definidora de sida mais comumente diagnosticada em doentes infetados por VIH, quer nos Estados Unidos da América (EUA), quer na Europa (Huang *et al.*, 2011; ECDC/WHO, 2018). Este facto pode dever-se à elevada morbilidade verificada nos infetados por VIH que não têm acesso à TARVc ou em casos em que esta terapêutica não é eficaz ou tolerada. Por outro lado, doentes que desconhecem o seu estado de

seropositividade para VIH ou que, por medo de estigmatização, optam por não procurar atendimento médico, contribuem também para estes números.

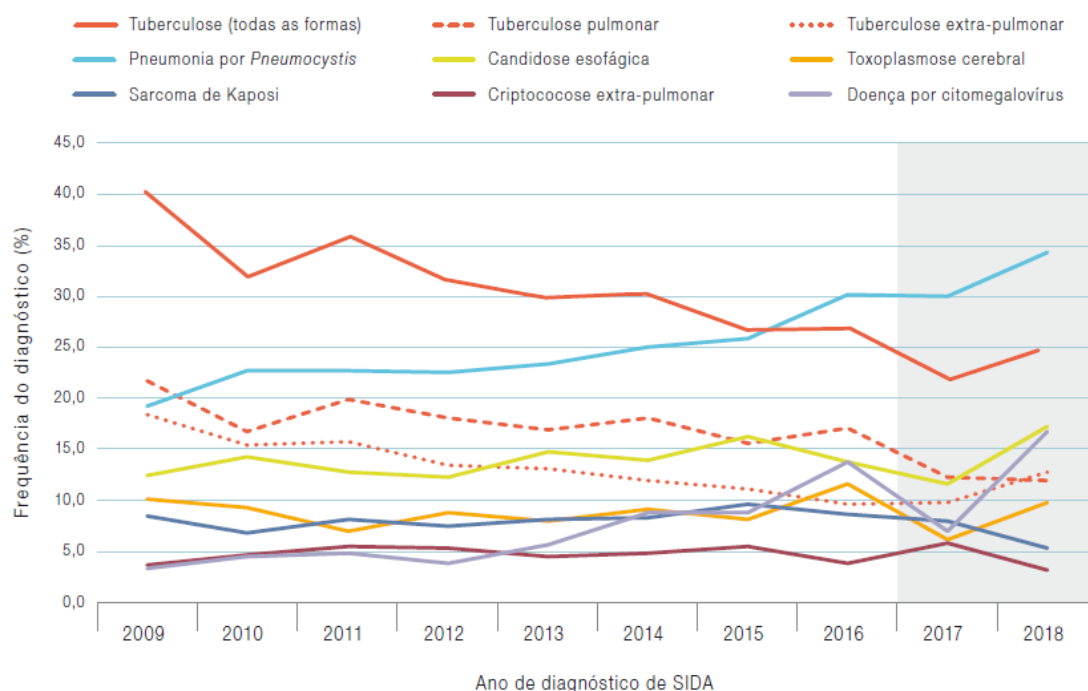
Por outro lado, o aumento do uso de agentes quimioterapêuticos e imunossuppressores, tem conduzido ao aumento da incidência e prevalência da PPc nos doentes imunocomprometidos não infetados por VIH daqueles países (Nüesch, Bellini & Zimmerli, 1999; Overgaard & Helweg-Larsen, 2007; Morris, Sciurba & Norri, 2008; Mori & Sugimoto, 2012; Avino, Naylor & Roecker, 2016). A incidência de PPc entre indivíduos com doença hematológica do foro oncológico, tumores sólidos, doenças autoimunes e transplantados tem aumentado progressivamente (Rodriguez & Fishman, 2004; Monnet *et al.*, 2008; Maini *et al.*, 2013; Bienvenu *et al.*, 2016) e está associada a taxas de mortalidade que variam entre 35% e 55% comparativamente a taxas de 10 a 20% verificadas em doentes infetados por VIH (Kim *et al.*, 2014).

No caso dos países de baixa-média renda, embora inicialmente a PPc fosse considerada uma patologia pouco frequente, atualmente tem-se verificado um aumento da perceção real da prevalência desta patologia nestes locais (Morris *et al.*, 2004; Lowe *et al.*, 2013; GAFFI, 2017; Oladele *et al.*, 2018). O caso dos países africanos é o mais relevante. Inicialmente, a frequência de infeção por *P. jirovecii* nos adultos seropositivos para VIH em países africanos rondava 5-11%. Apenas dois estudos, realizados em doentes do Zimbabué e do Uganda, apresentam uma frequência de 33 e 39%, respetivamente (Malin *et al.* 1995; Worodria *et al.* 2003; Morris *et al.* 2004). Estudos de revisão sistemática atuais, mostram que 77% dos casos de PPc registados têm origem em países africanos, seguindo-se o registo de 10% de casos com origem na América, 7% na Europa e 6% na Ásia (Bongomin *et al.*, 2017).

As baixas taxas inicialmente reportadas nos países africanos podem ser justificadas pelos limitados recursos financeiros e técnicos para o diagnóstico e pela carência de pessoal habilitado e experiente para efetuar o diagnóstico laboratorial de forma correta. Por outro lado, as elevadas taxas de infeção por bactérias e micobactérias dos adultos africanos seropositivos para VIH, resultam, grande parte das vezes, na morte destes doentes, antes deles atingirem um patamar de predisposição ao desenvolvimento de PPc (Morris *et al.*, 2004). Porém, como o acesso ao diagnóstico desta patologia nestes países de baixa-média renda continua a ser limitado, é difícil estimar a verdadeira incidência desta doença nestes locais. Dados atuais vêm corroborar esta afirmação, ao demonstrarem

que o produto interno bruto (PIB) *per capita* nestes países apresenta uma associação linear forte com a possibilidade de diagnóstico desta patologia (Lowe *et al.*, 2013).

Dados nacionais têm mostrado que, comparativamente a outros estudos europeus, Portugal mostra uma das menores incidências de PPc (Sabino *et al.* 2017). No entanto, desde 2016 que esta patologia voltou a ser a doença definidora de sida mais frequente no nosso país (figura 5) (Ministério da Saúde, 2019).



**Figura 5.** Gráfico representativo da frequência de diagnóstico das doenças definidoras de sida mais comuns em Portugal entre 2009 e 2018 (imagem adaptada de Ministério da Saúde, 2019).

Diferenças nas estimativas de prevalência de PPc entre os diversos países do mundo estão associadas a disparidades: na prevalência da infeção por VIH; na acessibilidade dos doentes infetados por VIH à TARVc e à quimioprofilaxia anti-*Pneumocystis*; e na acessibilidade a ferramentas/instalações de diagnóstico apropriadas (Bongomin *et al.*, 2017).

A análise da evolução epidemiológica desta patologia mostra que o controlo e a prevenção desta doença são áreas que requerem ainda muita atenção do ponto de vista da saúde pública mundial. Portanto, a pesquisa de novos e melhores métodos de diagnóstico e tratamento precoces da infeção por *Pneumocystis* são necessidades prementes.

### 1.1.6 Diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

Já foi discutido anteriormente neste capítulo que a apresentação clínica da pneumonia por *Pneumocystis* depende da patologia imunossupressora adjacente e da resposta inflamatória do doente, não havendo sinais e/ou sintomas específicos desta doença que permitam um diagnóstico definitivo, na ausência de evidência laboratorial da presença do fungo invasor nos pulmões do doente. Assim, a avaliação dos parâmetros clínicos, que no seu conjunto podem ser indicativos da doença, somente permitem estabelecer um diagnóstico presuntivo da infeção por *P. jirovecii*. Esses parâmetros que compreendem os testes de função pulmonar, a avaliação da gasimetria arterial, os exames radiológicos e laboratoriais inespecíficos, são os elementos que compõem o fundamento do diagnóstico presuntivo da PPc (Smith *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1988; Selwyn *et al.*, 1998; Barry & Johnson, 2001; Matos, Tomás & Antunes, 2017; Tomás & Matos, 2018).

O diagnóstico clássico e definitivo da PPc está dependente da observação ou deteção da presença de *P. jirovecii* em amostras respiratórias. Este facto torna o diagnóstico laboratorial da PPc um determinante fulcral na epidemiologia e controlo desta doença.

Ao contrário do que acontece com a maioria dos agentes patogénicos, não existe um meio de cultura estável e reprodutível para *P. jirovecii*, o que tem representado uma limitação significativa para o diagnóstico laboratorial da PPc. Apesar de em 2014, Schildgen e colaboradores terem divulgado um meio de cultura *in vitro* promissor para este microrganismo (Schildgen *et al.*, 2014), este ainda carece de validação experimental pois alguns investigadores já mostraram incapacidade de reproduzir os resultados apresentados (Liu, Fahle & Kovacs, 2018). Assim, o cultivo, propagação e isolamento deste microrganismo permanecem um desafio inacessível para fins de diagnóstico.

Entretanto, o diagnóstico clássico de PPc é baseado na identificação ou deteção de *P. jirovecii* nos fluidos e/ou tecidos afetados através de técnicas de coloração histoquímica ou de imunofluorescência com anticorpos monoclonais (IF-AcM), e/ou na deteção de ADN de *Pneumocystis* por técnicas moleculares (Tomás & Matos, 2018). Contudo, o sucesso deste diagnóstico está dependente dos recursos laboratoriais disponíveis, do grau de especialização da equipa laboratorial assim como do tipo de amostra biológica analisada.

### 1.1.6.1 Amostras biológicas

Amostras provenientes do trato respiratório inferior, como o lavado bronco-alveolar (LBA) ou a expetoração induzida (EI), são as amostras respiratórias mais comumente utilizadas no diagnóstico da PPc (Tomás & Matos, 2018). Estas e outras amostras biológicas também utilizadas (biópsia pulmonar, biópsia transbrônquica ou secreções brônquicas), são obtidas através de métodos invasivos que, para além de onerosos, são difíceis de realizar em doentes com insuficiência respiratória ou em crianças, e especialmente difíceis de implementar em países de baixa-média renda.

A biópsia pulmonar é a amostra *gold standard* para avaliação de doenças que causam inflamação pulmonar em doentes imunocomprometidos, permitindo a observação de *P. jirovecii* em mais de 95% dos casos de infeção (Rossiter *et al.*, 1979; Tomás & Matos, 2018). Contudo, para evitar a necessidade de procedimentos cirúrgicos, a amostra respiratória mais recomendada atualmente para o diagnóstico da PPc é o LBA. Esta amostra, obtida por broncofibroscopia, permite a visualização de *P. jirovecii* em mais de 80% dos casos de infeção e em mais de 95% dos casos de doentes seropositivos para VIH com PPc ativa (Baughman, Dohn & Frame, 1994; Fishman, 2002; Tomás & Matos, 2018). A EI é uma amostra respiratória obtida de forma menos invasiva que o LBA, requerendo a inalação de um soro salino a 1,8% durante 10 a 15 minutos, o que promove o aumento da transudação e a exfoliação traqueobrônquica. Contudo, a execução desta técnica está contraindicada em doentes com insuficiência respiratória e requer instalações com pressão negativa (Matos, Tomás & Antunes, 2017). Adicionalmente, a aplicação de técnicas de coloração não específicas em amostras de EI apresenta sensibilidade baixa (30-55%) em doentes com carga fúngica baixa (Rodriguez & Fishman, 2004; Tomás & Matos, 2018). Essa sensibilidade pode ser melhorada para valores entre os 60-97%, através da liquefação e concentração da amostra de EI, seguida de coloração por IF-AcM (Kovacs *et al.*, 1988; LaRocque *et al.*, 2003; Tomás & Matos, 2018).

Como amostras respiratórias alternativas, de obtenção minimamente invasiva, existe a possibilidade de se estudar a expetoração espontânea (EE), o lavado oral (LO) ou o aspirado nasofaríngeo (AN). Contudo, qualquer uma destas amostras possui um rendimento diagnóstico muito inferior ao obtido com a análise de amostras de LBA ou de EI. Assim, a melhor alternativa para utilização destas amostras no diagnóstico da PPc é

avaliá-las através de métodos de biologia molecular (Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018).

No que respeita ao diagnóstico da pneumocistose extrapulmonar, as amostras biológicas normalmente processadas correspondem a biópsias do tecido afetado, seguidas de exame histopatológico dos fragmentos do tecido obtidos (Moe & Hardy, 1994).

Assim, as amostras biológicas utilizadas atualmente para o diagnóstico da PPc obrigam ou à execução de técnicas altamente invasivas para a sua obtenção, ou à sua avaliação por métodos laboratoriais morosos, onerosos e que exigem instalações e equipas de profissionais qualificadas.

### **1.1.6.2 Técnicas de coloração**

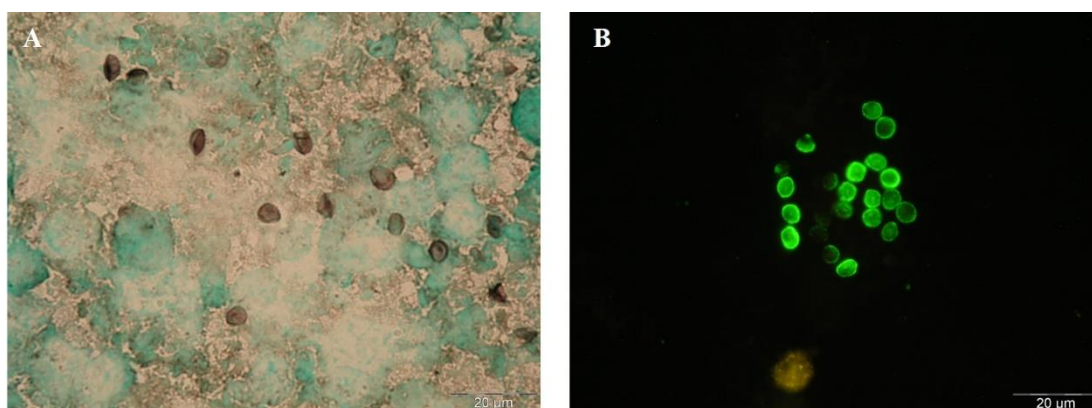
Através da microscopia ótica, vários métodos de coloração histoquímica estão descritos para a pesquisa de *Pneumocystis*. Os ascos deste microrganismo podem ser detetados com os corantes metenamina prata, azul de toluidina ou calcoflúor (Tomás & Matos, 2018), devido à sua boa afinidade para os componentes da parede desta forma de desenvolvimento de *Pneumocystis*. Durante muitos anos, a metenamina prata foi considerada o corante histoquímico de referência para o diagnóstico da PPc e é capaz de corar a parede dos ascos de tons cinzento-escuro (Figura 6A), não corando o seu conteúdo. O azul de toluidina deixa a parede do asco corada de azul claro, enquanto o calcoflúor lhe atribui uma coloração fluorescente.

A coloração dos núcleos das formas tróficas e dos ascósporos incluídos nos ascos de *Pneumocystis*, pode ser feita pelos métodos Giemsa ou Giemsa-modificado (*Diff-Quick*) (Tomás & Matos, 2018), surgindo estas formas com o núcleo corado de vermelho, rodeado por um citoplasma azulado e as paredes celulares sem coloração.

No entanto, a leitura destas técnicas de coloração inespecíficas necessita de um observador experiente e treinado, especialmente em amostras respiratórias de doentes com baixas cargas fúngicas, devido à possibilidade de ocorrência de coloração inespecífica e ambígua. Quando somente estão disponíveis técnicas de microscopia ótica para o diagnóstico da PPc, o recomendado é avaliar a amostra biológica do doente com duas técnicas de coloração, uma capaz de detetar as formas tróficas e outra capaz de detetar os ascos deste fungo (Tomás & Matos, 2018).



A microscopia de fluorescência veio permitir o desenvolvimento de técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e indireta (IFI) para detecção de *P. jirovecii*. As técnicas de IFD permitem a detecção quer de formas tróficas quer de ascos de *P. jirovecii*, enquanto as técnicas de IFI somente permitem a detecção dos ascos de *P. jirovecii* (ver figura 6B). Atualmente, existem *kits* comerciais destas técnicas disponíveis para o diagnóstico da PPc, que se fundamentam na ligação de anticorpos monoclonais específicos, marcados com moléculas fluorescentes (normalmente fluoresceína), a antígenos de superfície de *Pneumocystis*. No microscópio de fluorescência, a detecção do agente patogénico é possível pela visualização da cor verde característica, fornecida pelas moléculas de fluoresceína acopladas ao anticorpo que fez o seu reconhecimento e pela observação das formas características de *P. jirovecii*. Devido à sua fiabilidade, elevadas sensibilidade e especificidade, as técnicas de IF-AcM são atualmente as mais utilizadas no diagnóstico da PPc em laboratórios que possuem esta tecnologia (Baughman *et al.*, 1989; Lautenschlager *et al.*, 1996; Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018).



**Figura 6.** Fotografias de ascos de *Pneumocystis* corados pela técnica de metenamina prata (A) e pela técnica de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (B), observados com a ampliação de x1000 (adaptado de Tomás & Matos, 2018).

### 1.1.6.3 Diagnóstico molecular

A utilização de métodos moleculares para o diagnóstico surge com a necessidade de se aumentar a sensibilidade de detecção dos microrganismos patogénicos, por forma a ser possível estabelecer um diagnóstico precoce da doença e fazê-lo com recurso a amostras respiratórias menos invasivas. Por outro lado, a sequência de ácidos nucleicos é

característica e única para cada organismo, o que confere a estas técnicas também elevada especificidade de diagnóstico.

A técnica de PCR aplicada a diferentes genes alvo de *P. jirovecii* tem sido vastamente avaliada para o diagnóstico da PPc (Tomás & Matos, 2018). Esta técnica mostrou-se eficaz na amplificação de ADN de *Pneumocystis* em diversos tipos de amostras biológicas: LBA, EI, EE, LO, AN, secreções brônquicas, soro e sangue (Wakefield *et al.*, 1990b; Durand-Joly *et al.*, 2005). Contudo, a técnica de *nested*-PCR aplicada à amplificação da subunidade grande do RNA ribossómico mitocondrial (mtLSUrRNA) de *P. jirovecii*, é atualmente a mais utilizada para fins de diagnóstico. Com um limiar de deteção que pode atingir valores de 0,5 a 1 organismo por microlitro (µL) de amostra (Durand-Joly *et al.*, 2005; Tomás & Matos, 2018), esta técnica tem sido descrita como a mais sensível de entre todas as técnicas de PCR disponíveis para deteção de ADN de *P. jirovecii* (Totet *et al.*, 2003). O facto de mtLSUrRNA ser um gene multi-cópia no genoma de *P. jirovecii*, contribui amplamente para o sucesso desta técnica, especialmente por estarem envolvidos dois passos de amplificação (Olsson, Stralin & Hulmberg, 2001; Esteves *et al.*, 2012).

Recentemente, técnicas de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), têm sido também descritas para deteção de *P. jirovecii* utilizando uma grande variedade de genes alvo (Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018). A vantagem desta metodologia é que, para além dos resultados qualitativos em relação à presença do microrganismo, permite também a quantificação da carga fúngica presente na amostra analisada (Huggett *et al.*, 2008). Contudo, existe uma grande controvérsia na comunidade científica acerca dos limiares que devem ser considerados na interpretação destas técnicas, uma vez que o desempenho diagnóstico deste método não é igual entre doentes infetados ou não por VIH, bem como entre doentes com infeção ativa ou colonização por *P. jirovecii* (Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018).

Um problema significativo da utilização das técnicas de biologia molecular no diagnóstico da PPc é a dificuldade que estes métodos apresentam em distinguir casos de colonização por *P. jirovecii* de casos de doença ativa (Huggett *et al.*, 2008). De facto, os métodos moleculares permitem a deteção precoce do ADN de *P. jirovecii* em amostras respiratórias provenientes de doentes com resultados de microscopia negativa (Durand-Joly *et al.*, 2005; Rohner *et al.*, 2009). No entanto, um teste de PCR positivo associado a

microscopia negativa causa ambiguidade no diagnóstico da PPc, pois pode refletir a identificação de um caso de colonização por *P. jirovecii* ou de um caso de PPc ativa. Esta dúvida só pode ser esclarecida pelo clínico se a interpretação dos dados laboratoriais for feita em conjunto com o quadro clínico do doente (Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Assim, na prática clínica, considera-se um caso de colonização por *P. jirovecii* quando a infeção é assintomática e a análise laboratorial vem com avaliação microscópica negativa, mas com avaliação molecular positiva, devido à deteção do ADN do fungo na sua amostra biológica (Barry & Johnson, 2001; Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018). Nestes casos, os resultados falso-negativos dos exames microscópicos podem dever-se a cargas fúngicas muito baixas, indetetáveis por microscopia.

Estes dados mostram que a eficácia das técnicas de microscopia depende principalmente dos meios e tecnologia disponíveis, assim como do tipo de amostra biológica, da coloração utilizada e da experiência do examinador. Além disso, a interpretação do diagnóstico da PPc por métodos moleculares pode, por vezes, ser difícil quando os resultados da microscopia não são concordantes. Assim, constatamos que mesmo a tecnologia molecular e a sua combinação com métodos de coloração, pode falhar no estabelecimento de um diagnóstico preciso da PPc, o que mostra que é preciso trabalhar no desenvolvimento de métodos alternativos de diagnóstico desta patologia.

O quadro 1 resume os métodos clássicos de diagnóstico laboratorial da PPc e as suas características principais.

**Quadro 1.** Métodos laboratoriais clássicos aplicados ao diagnóstico da PPc e suas características principais (adaptado de Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018).

	Microscopia				Métodos Moleculares	
	MP	AT	Giemsa ou DQ	IF-AcM	PCR	RT-qPCR
Células alvo de <i>Pneumocystis</i>	Asco	Asco	Forma trófica e ascos	Asco (IFI, IFD) Forma trófica (IFD)	Todas	Todas
Amostra biológica recomendada	LBA	LBA	LBA	LBA ou EI	LBA ou EI (LO, EE, AN também possível)	LBA ou EI (LO, EE, AN também possível)
Sensibilidade	79% (LBA)	68% (LBA)	68% (LBA)	97% (LBA)	76-100% (LBA)	94-99% (LBA)
Especificidade	99% (LBA)	100% (LBA)	88% (LBA)	100% (LBA)	53-86% (LBA)	89-96% (LBA)
Tempo de resposta (h)	3	2	1	1 (IFD) a 2 (IFI)	8	4
<p><b>Legenda:</b> <b>MP</b>, metenamina prata; <b>AT</b>, azul de toluidine; <b>DQ</b>, <i>Diff-Quick</i>; <b>IF-AcM</b>, imunofluorescência com anticorpos monoclonais; <b>IFI</b>, imunofluorescência indireta; <b>IFD</b>, imunofluorescência direta; <b>nPCR</b>, <i>nested-PCR</i>; <b>RT-qPCR</b>, PCR quantitativo em tempo real; <b>LBA</b>, lavado broncoalveolar; <b>EI</b>, expetoração induzida; <b>LO</b>, lavado oral; <b>EE</b>, expetoração espontânea; <b>AN</b>, aspirado nasofaríngeo.</p>						

**Quadro 1 (Continuação).** Métodos laboratoriais clássicos aplicados ao diagnóstico da PPc e suas características principais (adaptado de Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018).

	Microscopia				Métodos Moleculares	
	MP	AT	Giensa ou DQ	IF-AcM	PCR	RT-qPCR
Vantagens	Semi-quantificação possível; barato.		Rápido; identificação de ascos e formas tróficas; semi-quantificação possível; barato.	Elevada sensibilidade e especificidade; identificação de ascos e formas tróficas; semi-quantificação possível	Aplicável a amostras não invasivas; detecção de baixas cargas fúngicas; permite genotipagem.	Aplicável a amostras não invasivas; detecção de baixas cargas fúngicas; permite quantificação.
Desvantagens	Precisa leitor experiente; bom desempenho depende de amostras obtidas de forma invasiva; protocolo demorado; só detecta ascos.		Precisa leitor experiente; bom desempenho depende de amostras obtidas de forma invasiva; interpretação difícil	Bom desempenho depende de amostras obtidas de forma invasiva; necessita equipamento caro e específico (microscópio de fluorescência)	Necessita de equipamento (termociclador), instalações e mão de obra especializada; elevada taxa de detecção de infecção assintomática (falsos positivos)	Necessita de equipamento (termociclador de PCR em tempo real), instalações e mão de obra especializada; elevada taxa de detecção de infecção assintomática (falsos positivos); controvérsia na interpretação dos resultados
<p><b>Legenda:</b> <b>MP</b>, metenamina prata; <b>AT</b>, azul de toluidine; <b>DQ</b>, <i>Diff-Quick</i>; <b>IF-AcM</b>, imunofluorescência com anticorpos monoclonais; <b>nPCR</b>, <i>nested-PCR</i>; <b>RT-qPCR</b>, PCR quantitativo em tempo real.</p>						

### **1.1.7 Tratamento e profilaxia da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii***

A mortalidade associada à pneumonia por *P. jirovecii* aumenta com a demora no diagnóstico da doença e, se deixada sem tratamento, pode chegar aos 100%, especialmente em doentes imunocomprometidos não infectados por VIH (Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Em 1989, as “diretrizes de profilaxia contra a pneumonia por *Pneumocystis carinii* (atualmente designada pneumonia por *P. jirovecii*) em pessoas infectadas por VIH” tornaram-se as primeiras diretrizes de tratamento relacionadas com a infeção por VIH, publicadas pelo governo dos EUA (CDC, 1989). Atualmente, a maioria das informações sobre profilaxia, tratamento e duração da terapia é extrapolada de diretrizes estabelecidas para doentes infectados por VIH (Panel on opportunistic infections in adults and adolescents with HIV, 2019) e de diretrizes estipuladas para outros doentes imunocomprometidos (Cooley *et al.*, 2014; Maertens *et al.*, 2016).

#### **1.1.7.1 Tratamento**

A estratificação da severidade da doença – ligeira, moderada ou grave – deve ser feita de acordo com os sintomas, a saturação de oxigénio e as alterações radiológicas (do tórax) apresentadas (Matos, Tomás & Antunes, 2017). Esta estratificação é importante e decisiva no estabelecimento das medidas terapêuticas a instituir, como o medicamento a administrar, o seu modo de administração (oral *versus* intravenoso), a necessidade de suporte respiratório, ou a necessidade de administração adjuvante de corticosteroides durante o processo terapêutico em meio hospitalar (Masur, 1992; Matos, Tomás & Antunes, 2017; Panel on opportunistic infections in adults and adolescents with HIV, 2019).

A combinação Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMZ) é o agente terapêutico de primeira linha contra a PPc devido à sua eficácia clínica, baixo custo, relativa segurança e disponibilidade em formulações intravenosa e oral (Masur, 1992; Matos, Tomás & Antunes, 2017). Esta terapia atua inibindo a síntese de ácido fólico, que é reconhecidamente a melhor forma de prevenir o crescimento de *P. jirovecii* (Masur, 1992). A sua formulação oral é adequada ao tratamento de doentes com casos ligeiros e moderados da doença, enquanto casos graves de PPc devem ser tratados com TMP-SMZ por via intravenosa (Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Nos casos de hipersensibilidade ou de resposta inadequada à terapêutica com TMP-SMZ, o combate à infecção pode ser feito com recurso à ação de fármacos alternativos (segunda linha), como pentamidina, a combinação primaquina-clindamicina ou atovaquona (Calderón et al., 2010; Matos, Tomás & Antunes, 2017), cujos mecanismos de ação estão apresentados no quadro 2.

**Quadro 2.** Fármacos mais comumente utilizados no tratamento da PPc e suas respetivas ações (adaptado de Calderón et al., 2010 e Matos, Tomás & Antunes, 2017).

<b>Fármaco</b>	<b>Severidade da PPc</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Linha de tratamento</b>	<b>Ação</b>
<b>TMP-SMZ</b>	Ligeira a grave	Oral ou intravenosa	1 <sup>a</sup>	Inibição da via metabólica dos folatos
<b>Pentamidina</b>	Ligeira a grave	Intravenosa ou aerossol	2 <sup>a</sup>	Inibição da via metabólica do ácido para-aminobenzóico; da glicólise anaeróbia; da fosforilação oxidativa; da síntese proteica
<b>Primaquina-clindamicina</b>	Ligeira a moderada	Oral	2 <sup>a</sup>	Inibição da síntese proteica e da cadeia respiratória
<b>Atovaquona</b>	Ligeira a moderada	Oral	Alternativa de 2 <sup>a</sup>	Inibição citocromo b

A administração de corticosteroides juntamente com o agente terapêutico, é considerada uma terapia adjuvante, altamente recomendada em indivíduos com doença moderada ou grave, pois pode suprimir o processo inflamatório agudo associado à PPc, reduzindo a probabilidade de insuficiência respiratória e morte do doente (Masur, 1992; Calderón et al., 2010; Matos, Tomás & Antunes, 2017). A sua administração em doentes imunocomprometidos não infetados por VIH é controversa, mas genericamente aconselhada em indivíduos com doença grave, pois a terapia adjuvante com corticosteroides está descrita como útil na redução da duração de ventilação mecânica e internamento destes doentes (Pareja, Garland & Koziel, 1998).

### 1.1.7.2 Profilaxia

O estabelecimento de um regime profilático é fundamental nos principais grupos de risco, uma vez que a PPc é considerada uma infecção grave e representativa de alta taxa de mortalidade em doentes imunocomprometidos (Moe & Hardy, 1994; Armstrong, Meintjes & Brown, 2014). Antes da implementação da profilaxia contra a PPc e do uso alargado da TARVc, a infecção por *P. jirovecii* ocorria em até 80% dos doentes com infecção por VIH (Moe & Hardy 1994; Lundberg, Davidson, & Burman, 2000). Contudo, a implementação de regimes profiláticos com fármacos eficazes e o controlo da imunossupressão destes doentes, contribuíram decisivamente para o declínio da frequência desta doença (Morris *et al.*, 2004).

Em termos profiláticos, a combinação TMP-SMZ é também o agente mais indicado para a prevenção deste organismo oportunista (Calderón *et al.*, 2010; Matos, Tomás & Antunes, 2017). Em doentes que não toleram esta quimioprofilaxia, esquemas alternativos incluem profilaxia com dapsona, dapsona com pirimetamina e leucovorina, pentamidina (aerossol) ou atovaquona (Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Atualmente existem diretrizes que definem períodos de suscetibilidade imunológica à PPc para doentes infetados por VIH, que orientam a utilização da quimioprofilaxia durante esses períodos (Panel on opportunistic infections in adults and adolescents with HIV, 2019), como se pode ler no quadro 3. Estas diretrizes foram estabelecidas quer para a profilaxia primária (primeiro episódio de PPc), quer para a profilaxia secundária (recidivas).

A profilaxia primária deve ser interrompida em doentes infetados por VIH que apresentem contagem de células T CD4<sup>+</sup> com valores entre as 100-200 células/mm<sup>3</sup> e cargas virais plasmáticas abaixo dos limites de deteção das técnicas aplicadas. Contudo, se a contagem de células T CD4<sup>+</sup> diminuir para valores inferiores ao estabelecido ou a carga viral se tornar detetável, a profilaxia deve ser reintroduzida (Panel on opportunistic infections in adults and adolescents with HIV, 2019).

A interrupção da profilaxia secundária segue a mesma lógica da primária, no entanto, se um episódio de PPc ocorrer num doente com contagem de células T CD4<sup>+</sup> acima de 200 células/mm<sup>3</sup>, esta profilaxia deve ser mantida durante toda a vida (Panel on opportunistic infections in adults and adolescents with HIV, 2019).



No que respeita à profilaxia dos doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH, existem dados relacionados com cada uma das condições específicas (Sowden & Carmichael, 2004; Tombly *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012, Neumann *et al.*, 2013). Contudo, nestes doentes a instituição bem como a duração ideal da quimioprofilaxia não estão bem estabelecidas, pelo que a profilaxia deve ser mantida enquanto as condições de imunossupressão se mantiverem presentes (Matos, Tomás & Antunes, 2017).

**Quadro 3.** Diretrizes para implementação de profilaxia primária e secundária em doentes infetados por VIH (adaptado de Panel on opportunistic infections in adults and adolescents with HIV, 2019).

<b>Populações específicas</b>	<b>Profilaxia Primária</b>
<b>Adolescentes, adultos, mulheres grávidas e doentes submetidos a TARVc</b>	Contagem células T CD4 < 200 células/mm <sup>3</sup> História clínica de candidíase orofaríngea e/ou outras infeções oportunistas Percentagem de células T CD4 <sup>+</sup> < 14%
<b>Doentes a quem não é feita a monitorização das células T CD4<sup>+</sup> de 3 em 3 meses</b>	Contagem células T CD4 <sup>+</sup> entre 200-250 células/mm <sup>3</sup>
	<b>Profilaxia Secundária</b>
<b>Doentes infetados por VIH e com história prévia de PPc</b>	Contagem células T CD4 <sup>+</sup> < 200 células/mm <sup>3</sup>

## 1.2 Estratégias alternativas de diagnóstico da pneumonia por

### *Pneumocystis jirovecii*

A necessidade de desenvolver métodos alternativos de diagnóstico que, preferencialmente, utilizem amostras biológicas obtidas por técnicas menos invasivas e tecnologias menos restritas do que as requeridas no diagnóstico clássico da PPc, atraiu a atenção da comunidade científica para as amostras de sangue e soro.

Sangue e soro começaram a ser testados como alternativa às amostras biológicas utilizadas no diagnóstico atual da PPc. Primeiro, a atenção foi dirigida à pesquisa de ADN de *P. jirovecii* no sangue e soro, apesar do ciclo de vida putativo deste microrganismo não envolver uma fase sanguínea (figura 2, pág. 8). No entanto, a aplicação de técnicas de PCR para detecção da presença do microrganismo nestas amostras demonstrou uma sensibilidade muito baixa (0%-30%) que variava consoante o gene analisado (Schluger *et al.*, 1991; Lipschik *et al.*, 1992; Roux *et al.*, 1994; Atzori *et al.*, 1995; Tamburrini *et al.*, 1996; Matos *et al.*, 1999; Rabodonirina *et al.*, 1999).

Assim, novas abordagens voltaram-se para a pesquisa e medição de biomarcadores serológicos da infeção. De entre os biomarcadores propostos, aqueles que foram mais estudados correspondem à molécula  $\beta$ -glucano de *P. jirovecii* e às moléculas antigénio KL-6 (do inglês, *Krebs von den Lungen-6*), lactato desidrogenase (LDH) e S-adenosilmetionina (SAM, do inglês *s-adenosylmethionine*) do hospedeiro (Tasaka *et al.*, 2007; Finkelman, 2010; Morris & Masur, 2011; Esteves *et al.*, 2014; Esteves *et al.*, 2015; Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018).

O  $\beta$ -glucano é o principal componente estrutural da parede celular dos ascos de *Pneumocystis* e níveis séricos elevados deste composto têm sido observados em doentes com PPc (Teramoto *et al.*, 2000; Tasaka *et al.*, 2007; Finkelman, 2010; Held *et al.*, 2011; Morris & Masur, 2011; Esteves *et al.*, 2014) tendo esses níveis diminuído de forma consistente com o tratamento anti-*Pneumocystis* (Teramoto *et al.*, 2000). Contudo, apesar de parecer um biomarcador promissor, esta molécula tem a desvantagem de estar presente na parede celular da grande maioria de outros fungos, o que compromete as taxas de especificidade para o diagnóstico de PPc (Finkelman, 2010; Esteves *et al.*, 2015). A correlação dos seus níveis séricos com a carga fúngica de *Pneumocystis* é outro parâmetro que compromete a utilização deste biomarcador no diagnóstico da PPc, principalmente em doentes sem infeção por VIH, os quais possuem normalmente cargas fúngicas mais

baixas (Nakamura *et al.*, 2009; de Boer *et al.*, 2011). Por fim, a inexistência de um valor de decisão ou *cut-off* ótimo, capaz de diferenciar casos de colonização de casos de doença ativa, é outro grande entrave à aplicação dos níveis séricos do  $\beta$ -glucano no diagnóstico de PPc (Tasaka *et al.*, 2007; Matsumura *et al.*, 2012; Damiani *et al.*, 2013).

Relativamente às moléculas do hospedeiro, os níveis séricos de antigénio KL-6, uma glicoproteína tipo mucina proeminente nos pneumócitos do tipo II, têm surgido aumentados em doentes com PPc (Hamada *et al.*, 1998; Tasaka *et al.*, 2007). No entanto, o aumento destes níveis é um indicador genérico de doença pulmonar intersticial e de lesão pulmonar aguda. A sua ocorrência não está diretamente dependente da presença de *P. jirovecii*, mas sim de danos nas células do parênquima pulmonar, o que compromete a especificidade diagnóstica deste biomarcador (Tasaka *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2009).

Por outro lado, a enzima LDH, também ela um marcador de dano celular, está normalmente aumentada em doentes com PPc e é utilizada no diagnóstico presuntivo da doença juntamente com outros sinais e sintomas, como anteriormente descrito. Porém, a falta de especificidade para com a infeção por *Pneumocystis*, faz com que a aplicação dos seus níveis, por si só, não permita o diagnóstico definitivo da doença (Tasaka *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2011).

Por fim, a aplicação dos níveis séricos de SAM, um importante intermediário metabólico, tem sido também discutida. Ao contrário dos biomarcadores anteriores, a aplicabilidade desta molécula no diagnóstico serológico da PPc não reúne consenso dentro da comunidade científica. Alguns autores sugerem que a presença de níveis baixos de SAM no sangue de doentes com PPc pode estar associada à capacidade de *P. jirovecii* captar SAM exógena, uma vez que não é capaz de a produzir endogenamente (Skelly *et al.*, 2003; Skelly, Holzman & Merali, 2008). Outros autores vêm contrariar esta afirmação, demonstrando a presença de um gene capaz de sintetizar SAM no genoma de *Pneumocystis* (Kutty *et al.*, 2008) e ausência de utilidade diagnóstica da SAM (de Boer *et al.*, 2011) na diferenciação de doentes com e sem PPc. Assim, de entre os biomarcadores analisados, este é o que apresenta menor potencial de aplicação no diagnóstico da PPc, uma vez que a relação entre os seus níveis séricos e a presença da infeção por *P. jirovecii* não está bem definida.

Esta análise de potenciais biomarcadores serológicos da infecção associados a moléculas do hospedeiro ou do microrganismo, vem demonstrar que, até aos dias de hoje, nenhum destes marcadores foi considerado estritamente específico para a infecção por *P. jirovecii*. Esse facto tem redireccionado a atenção dos estudos mais recentes para a pesquisa de anticorpos específicos, reativos contra *P. jirovecii* (Daly *et al.*, 2002; Bishop & Kovacs, 2003; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009; Tipirneni *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Djawe *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011; Blount *et al.*, 2012; Djawe *et al.*, 2013), e para a aplicação dos níveis desses anticorpos específicos no diagnóstico da PPc (Djawi *et al.*, 2010; Tomás *et al.*, 2016; Tomás *et al.*, 2019).

No entanto, essa estratégia de diagnóstico, tem sido difícil de implementar por dois fatores principais: a presença de níveis significativos de anticorpos anti-*P. jirovecii* no soro de indivíduos saudáveis, devido a infecção prévia ou a colonização (Medrano *et al.*, 2005; Morris & Norris, 2012); e à perda de células T CD4<sup>+</sup> e ocorrência de perturbações do compartimento de células B em indivíduos infetados por VIH, que conduzem à diminuição da quantidade e qualidade dos anticorpos produzidos (Moir & Fauci *et al.*, 2009), influenciando a resposta imunitária à infecção por *P. jirovecii*.

Relatos de PPc em doentes com mutações genéticas que afetam a produção de imunoglobulinas (Milledge *et al.*, 2003), assim como a própria incidência de casos de serologia positiva para *P. jirovecii* em adultos saudáveis, destacam o importante papel que a imunidade humoral parece desempenhar no controlo da PPc, apoiando a possibilidade dos níveis de anticorpos anti-*P. jirovecii* (IgG, IgM e IgA) poderem apresentar utilidade diagnóstica. Por outro lado, ensaios de imunodeteção de anticorpos anti-*Pneumocystis*, como técnicas imunoenzimáticas e/ou técnicas de *immunoblotting*, especialmente aquelas que utilizam antígenos recombinantes deste agente, têm-se revelado uma ferramenta interessante em estudos epidemiológicos e constituem uma possível ferramenta de diagnóstico (Daly *et al.*, 2002; Bishop & Kovacs, 2003; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009; Tipirneni *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Djawi *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011; Blount *et al.*, 2012; Djawi *et al.*, 2013; Tomás *et al.*, 2016; Tomás *et al.*, 2019).

### 1.2.1 Detecção de anticorpos reativos contra antígenos recombinantes de

#### *Pneumocystis jirovecii*

A impossibilidade de cultivar *P. jirovecii* *in vitro*, tem sido uma das limitações dos estudos serológicos pois os seus antígenos só conseguem ser obtidos em quantidades limitadas e, muitas vezes, encontram-se contaminados por proteínas do hospedeiro. Por outro lado, a utilização de antígenos derivados de *P. carinii* ou *P. murina* para avaliação de respostas humorais em humanos (Chatterton *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2001), é uma metodologia errónea, pois cada espécie de *Pneumocystis* é antigenicamente e molecularmente distinta. Assim, foram as dificuldades na obtenção de antígenos nativos de *P. jirovecii*, que conduziram os investigadores ao uso de antígenos recombinantes deste microrganismo, para pesquisa de anticorpos específicos em amostras biológicas de doentes.

Até à data, os antígenos recombinantes que têm sido mais explorados e que, ao mesmo tempo, têm demonstrado maior aplicação na deteção de resposta humoral contra *P. jirovecii*, são os antígenos baseados na Msg e na protease de serina do tipo kexina 1 (Kex1, do inglês *kexin-like serine protease 1*) deste microrganismo.

A Msg, como principal proteína antigénica de superfície de *P. jirovecii*, suscita interesse imediato. Além disso, sabe-se que esta proteína está diretamente envolvida no processo imunológico da PPc, contendo epítomos conservados para células B e T, e é específica deste fungo (Stringer, 2005).

Estudos da resposta imunitária face a esta proteína mostraram que antígenos recombinantes da Msg de *P. jirovecii* são reconhecidos por anticorpos séricos (IgG) de dadores de sangue e anticorpos séricos (IgG e IgM) de doentes com história prévia ou atual de PPc, como se pode ler no quadro 4. No primeiro desses estudos (Daly *et al.*, 2002), três fragmentos recombinantes de sobreposição, que abrangem todo o comprimento da Msg de *P. jirovecii* foram gerados: MsgA, MsgB e MsgC. Todos os fragmentos foram aplicados em técnicas ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) para deteção de anticorpos anti-*P. jirovecii* em amostras de soro de adultos saudável e doentes infetados por VIH. Os autores verificaram que soros de doentes seropositivos para VIH com episódio prévio de PPc, reconheciam a fração MsgC com maior frequência (59%) do que os soros de doentes que nunca experimentaram a doença (28%). No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente

significativas entre os níveis de anticorpos de doentes com ou sem história prévia de PPc, em relação aos outros fragmentos Msg. Estes resultados vieram confirmar a importância do papel dos anticorpos na defesa do hospedeiro contra a infeção por *P. jirovecii* e sugerir que os epítomos que estimulam esses anticorpos, podem estar preferencialmente localizados na região correspondente à fração recombinante MsgC.

Assim, estudos subsequentes focaram-se na pesquisa de anticorpos primordialmente contra a fração MsgC (ou MsgC1) e algumas variantes desta fração (MsgC3, MsgC8 e MsgC9) (Bishop & Kovacs, 2003; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009; Tipirneni *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Gingo *et al.*, 2011; Blount *et al.*, 2012; Djawe *et al.*, 2013). Os resultados destes estudos vieram confirmar que a região MsgC, para além de ser a mais conservada (Mei *et al.*, 1998) é a mais reativa (Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2009; Tipirneni *et al.*, 2009; Blount *et al.*, 2012) da proteína Msg. Adicionalmente, estes estudos vieram demonstrar que os doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH são capazes de montar uma resposta imunitária mais eficaz do que os doentes infetados por este vírus (Bishop & Kovacs, 2003; Blount *et al.*, 2012; Djawe *et al.*, 2013), e vieram reforçar a teoria de que a transmissão pessoa a pessoa é possível, uma vez que profissionais de saúde com contacto direto com doentes com PPc, apresentam níveis de anticorpos séricos reativos contra este fungo, superiores aos dos profissionais sem contato próximo com estes doentes (Tipirneni *et al.*, 2009).

Contudo, os resultados apresentados por estes autores são controversos em relação à aplicabilidade de cada uma das frações estudadas, pois a interpretação da aplicação de cada fração em diferentes populações de doentes e em indivíduos de diferentes regiões geográficas, varia (Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Gingo *et al.*, 2011). Assim, estes estudos vieram demonstrar a necessidade de se standardizar a ferramenta antigénica a utilizar em estudos serológicos, para que os resultados obtidos possam ser extrapolados para outras populações e otimizados em estudos subsequentes. Por outro lado, estes estudos somente revelaram a aplicabilidade destes antigénios recombinantes em estudos de seroprevalência de anticorpos anti-*P. jirovecii*, pelo que a extrapolação e validação da utilização destes antigénios como ferramentas no desenvolvimento de um método de diagnóstico serológico e alternativo da PPc, ficou por demonstrar.

Todavia, em 2010, foi feita a primeira demonstração da aplicabilidade da fração MsgC no diagnóstico da PPc (Djawe *et al.*, 2010). Neste estudo, os autores aplicaram o antígeno recombinante da MsgC desenvolvido por Daly e colaboradores em 2002, numa técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos da classe IgG e IgM anti-*P. jirovecii*. Neste estudo, os autores utilizaram esta técnica no diagnóstico da PPc, estudando uma população adulta de doentes com infeção por VIH que recorreu ao internamento hospitalar entre maio de 2000 e maio de 2008, por pneumonia. Os resultados demonstraram que doentes seropositivos para VIH com infeção ativa por *P. jirovecii* apresentavam níveis de IgG e IgM anti-*P. jirovecii* superiores aos de doentes seropositivos para VIH sem PPc no momento da admissão. Adicionalmente, mostraram que os níveis de anticorpos IgG reativos contra o antígeno recombinante utilizado permitia o diagnóstico da PPc com uma sensibilidade de 57,2% e uma especificidade de 61,7% no momento da admissão, as quais aumentavam para 63,4% e 100%, respetivamente, se o teste fosse efetuado quatro semanas após a admissão do doente. O mesmo verificava-se com os níveis de anticorpos da classe IgM, os quais apresentavam sensibilidade e especificidade de diagnóstico da PPc de 59,7% e 61,3% na altura da admissão, passando para 74,6% e 73,7%, respetivamente, quatro semanas após a admissão do doente.

Uma vez que esta necessidade de seguimento dos doentes e de recolha de múltiplas amostras respiratórias não é a abordagem ideal nem, muitas vezes, a abordagem possível na prática clínica, o problema técnico de como utilizar a deteção de anticorpos reativos contra a região MsgC no desenvolvimento de um método de diagnóstico precoce, sensível e específico da PPc, permanece até hoje.

**Quadro 4.** Características e principais conclusões de estudos baseados na detecção de anticorpos reativos contra antígenos recombinantes da Msg e Kex1 de *P. jirovecii*.

Populações estudadas	Antígeno estudado	Imunoglobulina detetada	Principais conclusões	Estudo
Dadores de sangue e doentes seropositivos para VIH	MsgA, MsgB, MsgC1	IgG	Doentes seropositivos para VIH com episódio prévio de PPc produzem níveis de anticorpos mais elevados contra a fração MsgC do que doentes sem episódios prévios de PPc ou do que dadores de sangue.	Daly <i>et al.</i> , 2002 e Daly <i>et al.</i> , 2004
Dadores de sangue e doentes seropositivos para VIH	MsgC1, MsgC3, MsgC8 e MsgC9	IgG	Doentes seropositivos para VIH com episódio prévio de PPc apresentam maior reatividade para todas as frações e, especificamente, níveis de anticorpos reativos contra a fração MsgC3 estatisticamente superiores aos dos doentes sem episódios prévios de PPc ou dadores de sangue.	Daly <i>et al.</i> , 2006
Dadores de sangue (americanos e espanhóis) e doentes seropositivos para VIH (espanhóis)	MsgC1, MsgC3, MsgC8 e MsgC9	IgG	Existem variações geográficas no reconhecimento das diferentes frações. Doentes seropositivos para VIH com episódio prévio de PPc têm maior reatividade para a fração MsgC8 do que doentes sem episódios prévios de PPc.	Daly <i>et al.</i> , 2009
Dadores de sangue, doentes seropositivos para VIH e outros doentes imunocomprometidos	Msg-14	IgG	Os níveis de anticorpos reativos contra o antígeno estudado são superiores em todos os doentes com episódio prévio de PPc do que em dadores, mas mais significativos em doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH.	Bishop & Kovacs, 2003
Profissionais de saúde com e sem contacto com doentes com PPc	MsgA, MsgB, MsgC1	IgG	Profissionais de saúde com contacto próximo com doentes com PPc apresentam níveis de anticorpos reativos contra a fração MsgC1 mais elevados do que os outros profissionais.	Tipirneni <i>et al.</i> , 2009



**Quadro 4 (Continuação).** Características e principais conclusões de estudos baseados na detecção de anticorpos reativos contra antígenos recombinantes da Msg e Kex1 de *P. jirovecii*.

Populações estudadas	Antígeno estudado	Imunoglobulina detetada	Principais conclusões	Estudo
Estudo longitudinal de doentes seropositivos para VIH	MsgC1, MsgC3, MsgC8 e MsgC9	IgG	Níveis séricos altos de anticorpos reativos contra a fração MsgC8, são marcadores de progressão da doença (morte). Os níveis séricos de anticorpos reativos contra as frações estudadas, formados durante o episódio de PPc, mantêm-se detetáveis durante meses.	Walzer <i>et al.</i> , 2009
Doentes seropositivos para VIH que tinham ou não desenvolvido PPc	MsgC1, MsgC3, MsgC8, MsgC9 e Kex1	IgG para frações Msg IgM e IgG para Kex1	Níveis séricos altos de anticorpos reativos contra a fração MsgC9, são marcadores de predisposição para a doença. Níveis séricos baixos de anticorpos reativos contra a Kex1 são marcadores de predisposição para a doença.	Gingo <i>et al.</i> , 2011
Estudo longitudinal de doentes seropositivos para VIH e outros doentes imunocomprometidos	MsgA, MsgB, MsgC1, MsgC3, MsgC8, MsgC9	IgG e IgM	Níveis séricos baixos de anticorpos reativos contra as frações MsgC3 e MsgC8 são marcadores de progressão da doença (morte). Doentes seropositivos para VIH possuem níveis de anticorpos IgM reativos contra as frações MsgC inferiores aos dos doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH	Blount <i>et al.</i> , 2012
Crianças seropositivas para VIH e crianças imunocomprometidas sem infecção por VIH, com e sem PPc	MsgC1, MsgC3, MsgC8 e MsgC9	IgG e IgM	PPc causa aumento dos níveis reativos de IgM contra os antígenos estudados em crianças seronegativas para VIH, mas não em crianças seropositivas para VIH. PPc causa aumento dos níveis reativos de IgG contra os antígenos estudados em crianças seropositivas para VIH, mas não em crianças seronegativas para VIH.	Djawa <i>et al.</i> , 2013

Mais recentemente, antígenos da Kex1 de *P. jirovecii* têm sido também alvo de interesse crescente. Esta proteína, apesar de não ser de superfície, parece estar envolvida no processamento pós-transcricional de outras proteínas, em especial das proteínas de superfície como as Msg, o que lhe confere um papel importante na capacidade de *P. jirovecii* interagir com as células do hospedeiro (Lee *et al.*, 2000; Kutty & Kovacs, 2003; Esteves *et al.*, 2009). Estudos com antígenos recombinantes desta proteína Kex1 têm evidenciado que os seus níveis são úteis na identificação de casos agudos de PPc ou mesmo na determinação do risco de desenvolvimento da doença (quadro 4) (Gingo *et al.*, 2011), e que estes antígenos poderão mesmo vir a ter aplicabilidade no desenvolvimento de vacinas efetivas contra a PPc (Tesini *et al.*, 2017; Kling & Norris, 2016).

O quadro 5 resume as características principais da Msg e da Kex1 de *P. jirovecii* e as razões que conduziram à produção de antígenos recombinantes baseados nestas proteínas e sua aplicação na pesquisa de anticorpos anti-*P. jirovecii* em estudos serológicos.

**Quadro 5.** Características principais da glicoproteína major de superfície e da protease de serina kexina 1 de *P. jirovecii*, assim como dos seus antígenos recombinantes.

<b>Glicoproteína major de superfície (Msg)</b>	<b>Protease de serina do tipo kexina 1 (Kex1)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Principal proteína antigénica de superfície de <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Stringer, 2005).</li> <li>✓ Proteína específica de <i>Pneumocystis</i>, não existindo em qualquer outro microrganismo (Stringer, 2005).</li> <li>✓ Proteína diretamente envolvida no processo imunológico da PPc, contendo epítomos conservados para células B e T (Stringer, 2005).</li> <li>✓ Proteína codificada por uma família de genes multi-cópia (Ma <i>et al.</i>, 2016; Hauser, 2019), conferindo variabilidade antigénica a <i>P. jirovecii</i> e capacidade de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro (Hauser, 2019).</li> <li>✓ Antígenos recombinantes desta proteína são reconhecidos por anticorpos séricos dos doentes com história prévia de PPc (Daly <i>et al.</i>, 2002).</li> <li>✓ A região carboxilo-terminal (MsgC) desta proteína contém a sequência mais conservada e mais reativa desta proteína (Mei <i>et al.</i>, 1998; Daly <i>et al.</i>, 2004; Daly <i>et al.</i>, 2009; Tipirneni <i>et al.</i>, 2009; Blount <i>et al.</i>, 2012).</li> <li>✓ Antígenos recombinantes sintéticos multi-epítomo desta região MsgC apresentam aplicabilidade no diagnóstico serológico da PPc (Tomás <i>et al.</i>, 2016).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Proteína codificada por um único gene, expressa no aparelho de Golgi de <i>P. jirovecii</i> (Lee <i>et al.</i>, 2000; Kutty &amp; Kovacs, 2003).</li> <li>✓ Proteína potencialmente envolvida no processamento pós-transcricional da Msg e nos processos moleculares que conduzem à invasão das células hospedeiras (Lee <i>et al.</i>, 2000; Kutty &amp; Kovacs, 2003).</li> <li>✓ Antígenos recombinantes desta proteína são reconhecidos por anticorpos séricos de doentes com PPc e mostram aplicabilidade na determinação do risco de desenvolvimento da doença (Gingo <i>et al.</i>, 2011).</li> <li>✓ Antígenos recombinantes desta proteína mostraram aplicabilidade na produção de anticorpos que conferem proteção contra a infeção por <i>P. jirovecii</i> (Tesini <i>et al.</i>, 2017; Kling &amp; Norris, 2016).</li> </ul>

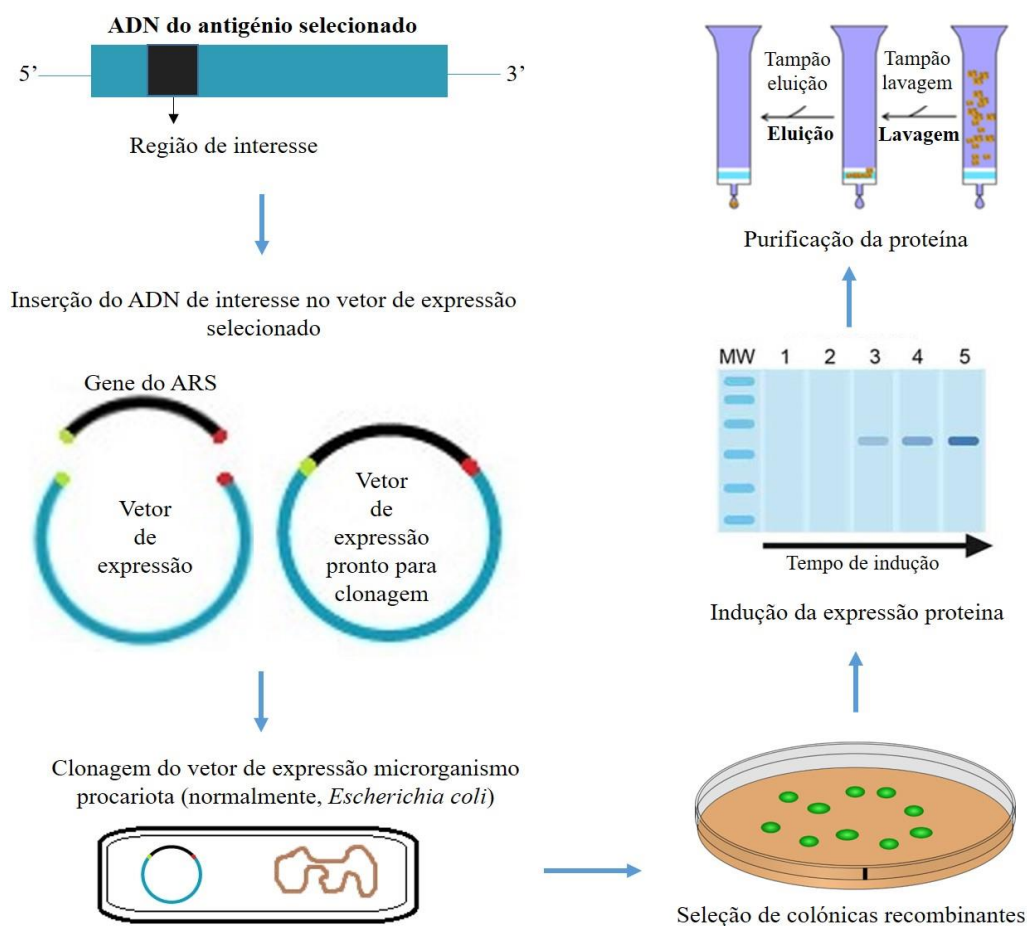
### **1.2.1.1 Tecnologia de produção de antígenos recombinantes para ensaios imunológicos**

O primeiro passo na produção de um antígeno recombinante, é a eleição do antígeno de interesse. Os antígenos mais imunogênicos são a escolha mais apropriada quando se procura estudar a resposta humoral contra determinado microrganismo, uma vez que estes são capazes de desencadear uma resposta imunitária forte e, conseqüentemente, a produção de níveis altos de anticorpos no indivíduo infetado. A sua localização na célula do microrganismo também deve ser considerada, uma vez que um antígeno superficial provavelmente induzirá uma resposta humoral mais forte do que um antígeno intracelular não tão exposto aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Com base nisso, o conhecimento profundo da superfície celular do microrganismo em estudo é essencial e a seleção de proteínas específicas do microrganismo deve ser encorajada, para se evitar reatividade cruzada com outros microrganismos ou com componentes do hospedeiro (Elguezabal *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2012; Tomás *et al.*, 2016).

Uma vez escolhido o antígeno a ser produzido, a seleção do vetor de expressão e sua clonagem num microrganismo adequado à expressão do antígeno recombinante, são também passos cruciais no sucesso da produção do antígeno de interesse. A seleção do vetor de clonagem deve ser feita considerando, pelo menos, o tamanho do fragmento a inserir, o método de purificação que se pretende utilizar após a expressão e os genes de resistência a antibióticos que cada vetor proporciona (Elguezabal *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2012; Tomás *et al.*, 2016). No que toca à seleção do microrganismo para expressão do antígeno de interesse, os microrganismos procariotas são os mais comumente utilizados pois, para além de permitirem uma produção mais fácil, rápida e económica do antígeno do que os microrganismos eucariotas, não promovem modificações pós-traducionais do péptido expresso, diminuindo a reatividade cruzada para com o antígeno produzido (Elguezabal *et al.*, 2005).

Após expressão e purificação eficientes do antígeno recombinante, este pode ser aplicado como ferramenta antigénica em testes serológicos, para detetar a presença de anticorpos específicos contra a sequência, ou conjunto de sequências, selecionadas do antígeno de interesse (Dai *et al.*, 2012; Tomás *et al.*, 2016). Se o antígeno recombinante permitir a obtenção de bons resultados no que respeita à pesquisa de anticorpos específicos contra o microrganismo em estudo, podem ser realizados estudos adicionais

para otimizar o método de diagnóstico e, mais tarde, implementá-lo na prática clínica. Assim, a tecnologia de produção de antígenos recombinantes fornece uma fonte altamente reprodutível de ferramentas antigênicas e os passos que envolvem a sua produção estão esquematizados na figura 7.



**Figura 7.** Esquema ilustrativo dos passos envolvidos no processo de síntese, expressão e purificação de antígenos recombinantes. Após seleção da sequência do antígeno recombinante de interesse, a inserção do seu ADN no vetor de expressão selecionado depende do desenho de oligonucleótidos adequados. Após clonagem desse vetor de expressão na estirpe bacteriana selecionada para a expressão do antígeno, a seleção de colônias recombinantes é o passo que se segue. Posteriormente, a indução da expressão proteica do antígeno nas bactérias transformadas deve ser feita tendo em conta as características genéticas do vetor de clonagem utilizado. O processo culmina com a purificação do antígeno por métodos adequados, como por exemplo, por cromatografia de afinidade.

Outra abordagem possível para averiguar o potencial de antígenos recombinantes como ferramentas de detecção de anticorpos específicos, é a produção de antígenos recombinantes sintéticos das proteínas de interesse, que possuam multi-epítomos imunorreativos dessa mesma proteína. Esta tecnologia já foi utilizada com sucesso no desenvolvimento de um método de diagnóstico serológico da infecção por *Toxoplasma gondii* (Dai *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2013) e foi aplicada no presente trabalho no desenvolvimento de antígenos recombinantes sintéticos multi-epítopo da Msg e Kex1 de *P. jirovecii* (Tomás *et al.*, 2016; Tomás *et al.*, 2019).

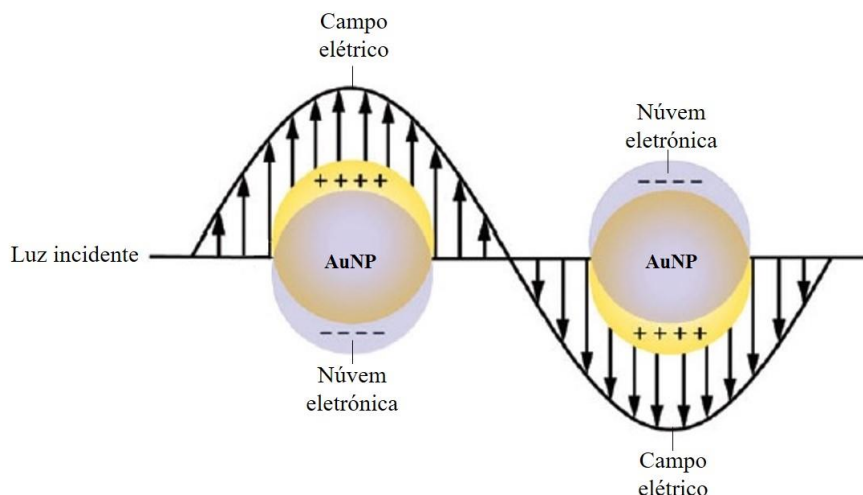
### 1.3 Nanopartículas de ouro e bioconjugados: aplicação no diagnóstico clínico

Os ensaios de detecção de determinadas biomoléculas (como antigénios) em amostras clínicas, tornam-se mais rápidos, mais sensíveis e mais flexíveis quando se associam nanomateriais aos processos de detecção (Baptista *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014). De entre os nanomateriais disponíveis, as nanopartículas de ouro (AuNP, do inglês *gold nanoparticles*) têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de plataformas de nanodiagnóstico clínico (Baptista *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2011; Cao, Ye, & Liu, 2011; de Almeida *et al.*, 2014; Cordeiro *et al.*, 2016). As propriedades e características únicas destas partículas, como cor intensa, comportamento espectral ajustável, estabilidade elevada, área de superfície elevada e facilidade de produção e funcionalização com biomoléculas, são grandes motivações para a sua utilização nestas plataformas e serão detalhadas em seguida.

#### 1.3.1 Propriedades e síntese de AuNP

O ouro coloidal é uma suspensão de aglomerados nanométricos de átomos de ouro (AuNP), que apresentam propriedades óticas, elétricas e químicas significativamente diferentes das propriedades do ouro à macroescala como estabilidade alta, solubilidade em água, tamanho, dispersão e morfologia controláveis, assim como uma superfície de funcionalização simples e uma área superficial elevada (Mody *et al.*, 2010).

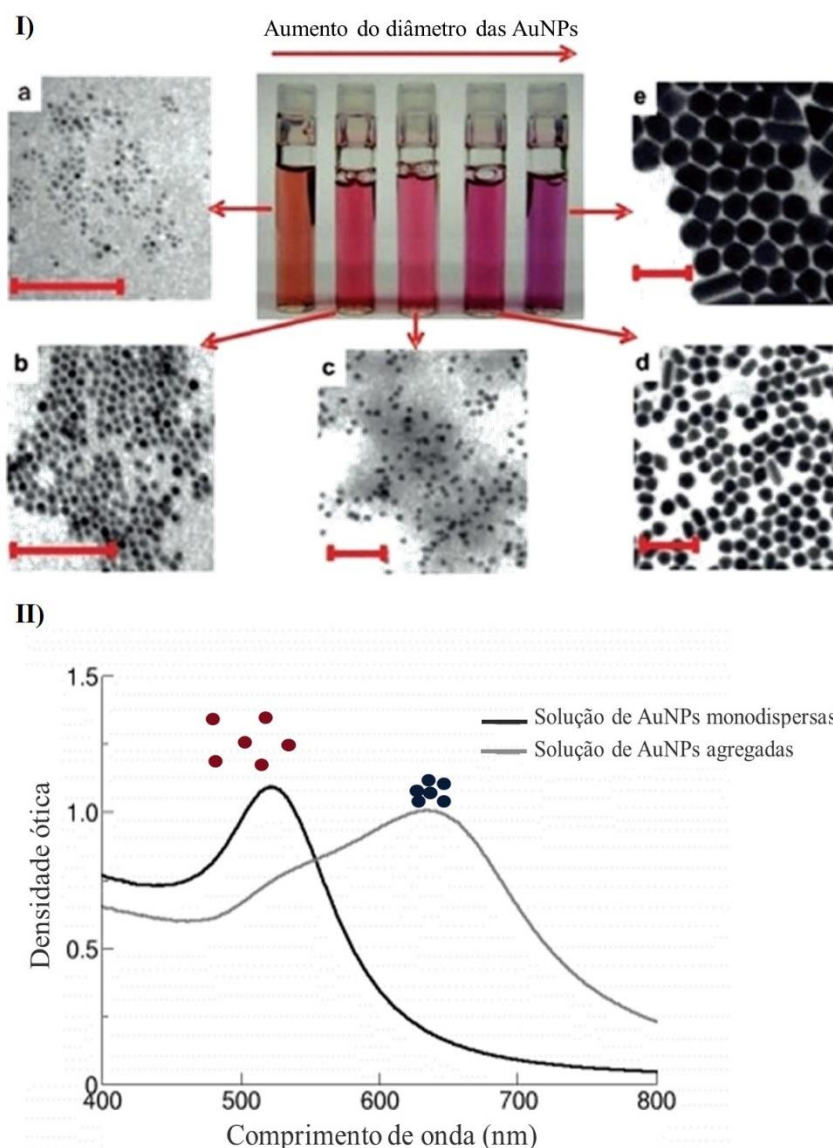
Com diâmetro normalmente compreendido entre 1 a 100 nm, as AuNP possuem propriedades óticas notáveis, como cor vermelha intensa e dispersão de luz elevada, que têm sido especialmente exploradas no desenvolvimento de métodos de detecção colorimétrica de biomoléculas (Liz-Marzán, 2006; Jain *et al.*, 2008; Mody *et al.*, 2010; Baptista *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014). Essas propriedades advêm da oscilação dos eletrões do metal, induzida pelo campo elétrico da luz, fenómeno conhecido como ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR, do inglês *localized surface plasmon resonance*) (Liz-Marzán, 2006; Masson, 2017). Quando uma partícula de metal é exposta à luz, a oscilação do campo magnético da luz incidente induz a oscilação coletiva dos eletrões livres do metal. Esta oscilação em torno da superfície da partícula, causa separação de cargas em relação à estrutura iónica, originando uma oscilação do dipolo ao longo da direção do campo elétrico da luz (figura 8).



**Figura 8.** Esquema representativo do fenómeno de ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR) das AuNP (adaptado de Cobley *et al.*, 2011).

Esta LSPR induz forte absorção de luz incidente, entre os 520 e 800 nm, por parte das AuNP, que pode ser medida com recurso a um espectrofotómetro de ultravioleta-visível (UV-vis) (Jain *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2014). Assim, soluções coloidais de AuNP com cerca de 15 nm de diâmetro, apresentam cor vermelha devido ao facto de a sua banda de LSPR apresentar um pico de absorção máxima a, aproximadamente, 520 nm (Jain *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2014). Contudo, à medida que o diâmetro das AuNP aumenta ou a distância entre nanopartículas diminui conduzindo à formação de agregados em suspensão, a banda da LSPR vai sofrendo desvios para comprimentos de onda superiores, ficando cada vez mais alargada (figura 9).





**Figura 9.** Variação da cor de suspensões de AuNP com diferentes tamanhos e do pico de absorção das bandas LSPR na presença de AuNP monodispersas *versus* AuNP agregadas. **(I)** Fotografia de soluções aquosas de AuNP esféricas em função das suas dimensões e respectivas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (a-e), com escala assinalada correspondente a 100 nm (adaptado de Mody *et al.*, 2010). **(II)** Representação do comportamento das bandas LSPR de AuNP monodispersas e agregadas, segundo leitura num espectrofotómetro de ultravioleta-visível.

Este fenómeno é explicado pela menor absorção de luz no espectro UV-vis, à medida que as nanopartículas vão adquirindo grandes dimensões e adaptando a forma de um filme de metal contínuo, razão pela qual o efeito da LSPR não se verifica à macroescala (Liz-Marzán, 2006; Mody *et al.*, 2010; Masson, 2017). Assim, através da variação das características físico-químicas das AuNP (como forma e tamanho) ou alteração da composição do meio envolvente (como aumento da força iónica ou alteração do pH da solução), é possível alterar o comprimento de onda de extinção máxima da LSPR.

Esta deslocação da banda da LSPR das AuNP tem sido largamente utilizada na deteção colorimétrica de biomoléculas, quer por indução da agregação das AuNP na presença do analito em estudo (Storhoff *et al.*, 2002; Baptista *et al.*, 2005; Liu, Rodriguez & Lee, 2005; Baptista *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), quer por variação do índice de refração à superfície das AuNP (Yu & Irudayaraj, 2007; Soares *et al.*, 2014), devido à adsorção do analito de interesse à superfície destas nanopartículas. Por outro lado, a sua cor intensa, visível a olho nu, mesmo na presença de quantidades reduzidas do analito específico a detetar, tem permitido a sua aplicação no desenvolvimento de ensaios de biodiagnóstico altamente sensíveis, económicos e com aplicação no local de prestação de cuidados de saúde (*point-of-care*) (Chandler, Gurmin & Robinson, 2000; Tanaka *et al.*, 2006; Baptista *et al.*, 2008; Chun, 2008; Quesada-González & Merkoçi, 2015).

Porém, a utilização bem-sucedida destas nanopartículas em ensaios biológicos depende da disponibilidade de métodos que garantam a síntese reproduzível, rápida e simples de AuNP com as características desejadas (Baptista *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014).

Apesar da existência de inúmeras estratégias de síntese de AuNP (Turkevich, Stevenson & Hillier, 1951; Brust *et al.*, 1994; Daniel & Astruc, 2004; Green, 2005; Murphy *et al.*, 2005), a maioria dessas estratégias é baseada na redução química ou eletroquímica de um composto precursor de ouro (III) na presença de um agente de revestimento. Este agente de revestimento deve ser capaz de se ligar à superfície das AuNP, controlando o seu crescimento e, ao mesmo tempo, deve promover a estabilização do coloide, evitando a agregação das AuNP no solvente utilizado (Baptista *et al.*, 2011).

A adsorção do agente de revestimento na superfície das AuNP pode ocorrer por quimissorção ou por fisissorção (interação eletrostática ou hidrofóbica). Contudo, normalmente, pretende-se que este processo seja dinâmico e reversível, sendo possível a

remoção deste agente por lavagem excessiva das AuNP ou a sua troca por outra molécula de revestimento, adicionada num processo de funcionalização das AuNP (Baptista *et al.*, 2011). Assim, a seleção das condições experimentais de síntese, como o agente redutor utilizado, o tempo e temperatura da reação, assim como o agente de revestimento escolhido, deve ser adequada ao tamanho, forma e aplicações pretendidas para as AuNP sintetizadas (Baptista *et al.*, 2011).

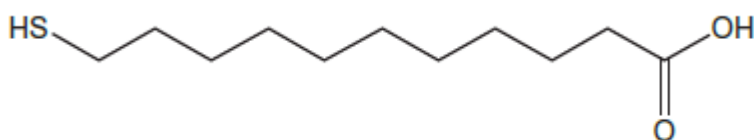
Tendo em conta todos estes fatores, os métodos mais comumente utilizados para a preparação de AuNP esféricas para ensaios biológicos baseiam-se no método “clássico”, descrito por Turkevich e colaboradores em 1951 (Turkevich, Stevenson & Hillier, 1951), devido à sua simplicidade e alto rendimento. Neste método, o citrato de sódio é utilizado como agente redutor e, simultaneamente, como estabilizador coloidal através do revestimento das AuNP obtidas, conferindo-lhes uma camada superficial de iões carregados negativamente, que impede a sua agregação através de forças repulsivas. Este método produz AuNP razoavelmente monodispersas e estáveis em água, que podem ser funcionalizadas facilmente com marcadores biológicos modificados com grupos funcionais que apresentem maior afinidade para o ouro do que o citrato (Lim *et al.*, 2014). Adicionalmente, por norma, quanto maior a concentração deste agente redutor, menores as partículas resultantes, pelo que modificações no protocolo permitem controlar e adaptar o tamanho e forma geométrica das AuNP às características pretendidas (Frens, 1973; Kimling *et al.*, 2006; Bastús, Comerge & Puentes, 2011).

### 1.3.2 Funcionalização de AuNP

De forma a aumentar a estabilidade das AuNP em solução, recorre-se à sua funcionalização (Baptista *et al.*, 2011). Neste processo, a superfície das AuNP é modificada com moléculas que além de estabilizarem as AuNP em solução, lhes podem conferir propriedades ajustáveis às necessidades. Assim, o agente de revestimento utilizado no método de síntese é normalmente substituído por uma molécula bifuncional, que possui uma extremidade capaz de estabelecer ligações fortes com a superfície das AuNP, e outra extremidade com uma funcionalidade química/biológica pretendida, que ficará livre para interatuar com as moléculas alvo (Baptista *et al.*, 2011; Franco & Pereira, 2013). Estas moléculas de funcionalização são então utilizadas na atribuição de

características superficiais como hidrofília/hidrofobicidade, carga e/ou capacidade de ligação a outras (bio)moléculas (Franco & Pereira, 2013).

De entre estas moléculas, destaca-se o alcanotiol ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA), molécula comumente utilizada na funcionalização de AuNP para posterior conjugação com biomoléculas, cuja composição química está representada na figura 10 (Sperling & Parak, 2010; Baptista *et al.*, 2011; Franco & Pereira, 2013; Lim *et al.*, 2014). O 11-MUA é uma molécula bifuncional constituída por um grupo tiol (-SH) na extremidade amino-terminal, que se liga covalentemente às nanopartículas, e um grupo carboxilo (-COOH) na extremidade carboxilo-terminal que, a pH adequadamente elevado, confere carga negativa uniforme à superfície das AuNP e a sua estabilidade em solução, assim como a possibilidade de formação de interações eletrostáticas com biomoléculas (Sperling & Parak, 2010; Baptista *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2014). A sua longa cadeia alifática, forma uma camada densa em torno das AuNP, auxiliando assim na estabilização coloidal das AuNP funcionalizadas.



**Figura 10.** Estrutura do ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA).

Este ligando tem sido maioritariamente utilizado na conjugação das AuNP com proteínas, através do estabelecimento de interações eletrostáticas, nomeadamente com o citocromo *c*, uma proteína que contém uma face carregada positivamente (rica em lisinas) e que é responsável pela interação desta proteína com as faces carregadas negativamente dos seus parceiros fisiológicos (Gomes *et al.*, 2012; Bolat *et al.*, 2013).

### 1.3.3 Bioconjugação de AuNP

Para além do potencial de transdução de sinal em processos de deteção de biomoléculas através da modificação das propriedades óticas das AuNP, as propriedades de bioconjugação destas nanopartículas, usando processos que permitem manter a atividade bioquímica das biomoléculas marcadas, têm tornando as AuNP ótimas

ferramentas para várias aplicações quer ao nível do diagnóstico quer ao nível do tratamento (Hermanson, 2008; Baptista *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014; Qian, 2014).

Várias moléculas biológicas têm sido conjugadas com AuNP, por forma a criar ferramentas altamente sensíveis aplicáveis em biossensores. O produto desta reação de conjugação é geralmente denominado “bioconjugado” e pode ocorrer através de: (i) atração eletrostática entre a carga superficial da AuNP (normalmente negativa) e a carga oposta das biomoléculas; (ii) adsorção química direta da biomolécula à superfície da AuNP através de grupos tiol ou amina; (iii) adsorção química dos grupos funcionais presentes na superfície da AuNP com os grupos funcionais da biomolécula de interesse (iv) ligações por afinidade específica, como por exemplo através do sistema biológico avidina-biotina (Baptista *et al.*, 2011; Franco & Pereira, 2013; Qian, 2014). Uma esquematização dos processos de bioconjugação está presente na figura 11.

As interações eletrostáticas são o processo mais simples de bioconjugação e promovem uma ligação com alguma estabilidade da biomolécula à superfície da AuNP, não apresentando, no entanto, controlo sobre a orientação e/ou disposição final da molécula adsorvida. Contudo, para que este fenómeno ocorra, certas condições devem ser controladas por forma a que a AuNP e a biomolécula tenham cargas opostas, o que torna este processo sensível ao pH e à força iónica do meio, assim como à presença de outras moléculas carregadas em solução (Baptista *et al.*, 2011; Qian, 2014).

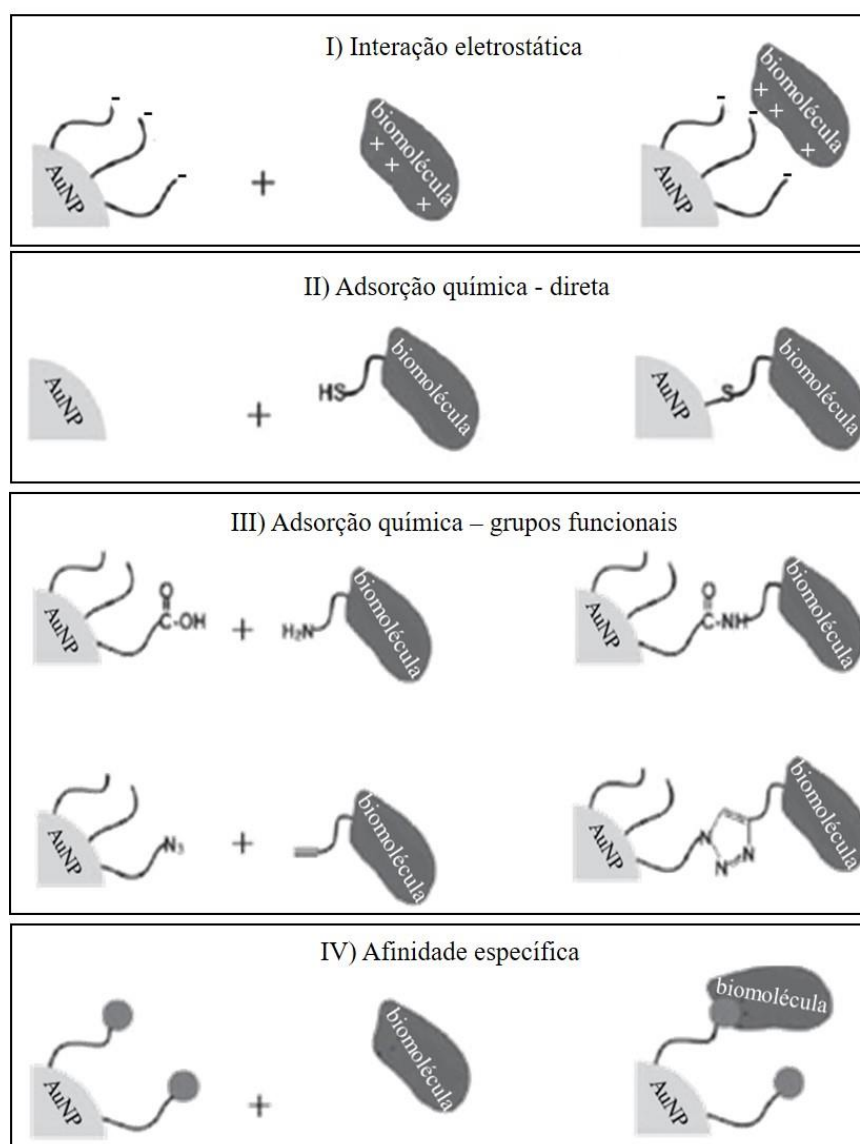
A adsorção química ou quimiossorção, proporciona uma ligação mais estável do que a fisiossorção e é a mais aconselhada para obtenção de bons desempenhos das AuNP em ambientes químicos e/ou biológicos complexos (Baptista *et al.*, 2011; Qian, 2014).

A quimiossorção direta é um processo de bioconjugação possível na presença de biomoléculas com grupos funcionais capazes de estabelecer ligação com o metal. Todavia, a força das ligações estabelecidas entre esses grupos funcionais e o metal são por norma tão fortes, que podem comprometer a atividade biológica da biomolécula, principalmente se esta for uma proteína, quer pela alteração da sua estrutura terciária, quer pelo bloqueamento do seu centro ativo (Baptista *et al.*, 2011; Franco & Pereira, 2013; Qian, 2014).

Em alternativa, existe o processo de bioconjugação por quimiossorção mediada por moléculas intermediárias, que serão as responsáveis pela ligação covalente entre a AuNP e a biomolécula pretendida (Baptista *et al.*, 2011; Qian, 2014). A utilização dos agentes

de reticulação EDC/NHS (cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/N-hidroxisuccinimida), como mediadores da formação de uma ligação amida entre as AuNP com grupos carboxilo superficiais e os grupos amina disponíveis nas proteínas, é uma das metodologias mais populares deste processo de conjugação (Baptista *et al.*, 2011; Conde *et al.*, 2014)

No que respeita à conjugação por afinidade específica, as interações envolvidas podem ser estabelecidas entre moléculas biologicamente relacionados, como a ligação específica entre as moléculas de biotina e estreptavidina, ou entre ligandos sintéticos e biomoléculas, como a ligação entre o complexo Ni-NTA (formado por íões níquel e ácido nitrilotriacético) e proteínas marcadas com caudas de poli-histidinas. Estas ligações são altamente seletivas e suficientemente estáveis, sob condições ótimas. Porém, esta estratégia pode requerer a funcionalização prévia dos AuNP com um dos parceiros de ligação e a funcionalização da biomolécula com o outro parceiro de ligação (Baptista *et al.*, 2011; Qian, 2014).



**Figura 11.** Representação esquemática de diferentes abordagens de bioconjugação: **(I)** interações eletrostáticas, **(II)** adsorção química direta através de grupos tiol (-SH) da biomolécula **(III)** adsorção química mediada por grupos funcionais presentes quer na AuNP quer na biomolécula e **(IV)** ligações por afinidade específica (Adaptado de Qian, 2014).

#### 1.3.4 Bioconjugados AuNP-proteína: otimização e caracterização

Qualquer procedimento de conjugação, requer a otimização da proporção dos reagentes, de forma a se obterem conjugados com as aplicações pretendidas. No processo de conjugação de AuNP com proteínas, vários parâmetros devem ser considerados na sua

otimização: as características de superfície das AuNP (já discutidas acima); o ponto isoelétrico (pI) da proteína; o pH do meio em que ocorre o processo de adsorção; a quantidade de proteína que deve ser utilizada na conjugação; e a manutenção da atividade biológica da proteína de interesse (Hermanson, 2008; Franco & Pereira, 2013).

Genericamente, a maioria das proteínas atinge o seu potencial máximo de adsorção às AuNP num pH próximo ou ligeiramente acima do seu pI, pelo que se acredita que a eficiência do processo de conjugação é aumentada se a reação de adsorção ocorrer a um valor de pH dentro da faixa do pI da proteína de interesse (Norde, 1986; Hermanson, 2008).

Além disso, todos os conjugados AuNP:proteína devem ser otimizados quanto à manutenção da atividade funcional da proteína. Neste aspeto, o processo de conjugação utilizado, o rácio proteína:AuNP, assim como o tamanho das nanopartículas utilizadas (isto é, a sua curvatura), são fatores a ter em consideração (Hermanson, 2008; Franco & Pereira, 2013). A conjugação por adsorção química direta da proteína ao metal é um processo que pode provocar a alteração da atividade funcional da proteína, como discutido anteriormente (Baptista *et al.*, 2011; Franco & Pereira, 2013; Qian, 2014). Por sua vez, quer a quantidade de proteína adicionada quer a curvatura das AuNP são fatores que interferem na ocorrência de interações laterais proteína-proteína, que normalmente as deixam menos disponíveis para as interações biológicas pretendidas (Franco & Pereira, 2013). Um aumento da curvatura das AuNP (menor diâmetro) e um rácio proteína:AuNP que evite uma sobrecarga de proteína na solução e à superfície da AuNP, são parâmetros que diminuem a ocorrência de interações laterais proteína-proteína não-cooperativas. Assim, a atividade biológica da proteína (como interação com o substrato, no caso de uma enzima, ou interação com um anticorpo, no caso de um antigénio) fica mais preservada e a proteína mais disponível para interações específicas com o solvente (Franco & Pereira, 2013).

### **1.3.4.1 Caracterização de conjugados AuNP-proteína por eletroforese em gel de agarose**

Outro fator importante no processo de conjugação e sua otimização é a caracterização dos conjugados no que respeita à qualidade e quantidade dos conjugados AuNP-proteína formados. Tanto a técnica de eletroforese em gel de agarose (EGA) como as técnicas de



espectroscopia (como por exemplo, espectroscopia de dispersão de luz, espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia vibracional) são ferramentas poderosas para essa caracterização (Franco & Pereira, 2013). Enquanto as técnicas espectroscópicas são técnicas complementares, que muitas vezes exigem a execução de duas ou mais técnicas para uma caracterização completa dos conjugados, a EGA permite a obtenção de resultados qualitativos e quantitativos no que respeita à coroa proteica formada em torno das AuNP (Franco & Pereira, 2013), tendo sido a técnica utilizada para caracterização dos conjugados formados neste estudo.

A EGA é uma técnica clássica de separação de biomoléculas como ADN e proteínas. Mais recentemente, é também utilizada em bionanotecnologia, para a caracterização de AuNP e seus conjugados com biomoléculas (Hanauer *et al.*, 2007; Lopez-Lorente, Simonet & Valcarce, 2011; Franco & Pereira, 2013; Zhen *et al.*, 2015; Kim, Wark & Lee., 2016).

Nesta técnica, a velocidade de migração das nanopartículas e seus bioconjugados num processo de eletroforese varia de acordo com a equação 1, onde  $v$  é a velocidade,  $E$  é o campo elétrico,  $q$  é a carga da molécula em solução e  $f$  é a resistência à mobilidade da partícula (Sheehan, 2013):

$$v = \frac{Eq}{f} \quad \text{Equação 1}$$

A resistência à mobilidade da partícula é dependente da massa e forma da partícula, da viscosidade dos tampões e da porosidade da matriz de agarose utilizada. Assim, em condições experimentais controladas (lote de AuNP, campo elétrico, tampão de corrida e porosidade da matriz de agarose), a velocidade de migração das AuNP e seus bioconjugados irá variar consoante a quantidade de proteína adsorvida à superfície das AuNP, uma vez que esta proteína adsorvida contribui decisivamente para alterações na carga superficial, massa ou forma da nanopartícula (Hanauer *et al.*, 2007; Zhen *et al.*, 2015). Portanto, é de se esperar que com o aumento da quantidade de proteína adsorvida na superfície da nanopartícula, diminua a sua velocidade de migração em direção ao ânodo, pois há aumento do tamanho da nanopartícula e diminuição da sua carga negativa superficial (Franco & Pereira, 2013).

Assim, esta técnica permite uma caracterização dos conjugados através da avaliação da sua mobilidade eletroforética (Guirgis *et al.*, 2012, Cavadas *et al.*, 2016, Kim, Wark & Lee., 2016, de Almeida *et al.*, 2018). A mobilidade eletroforética ( $\mu$ , em  $\text{cm}^2/\text{V.s}$ ), por sua vez, depende do tamanho e carga dos bioconjugados, o que se reflete na sua velocidade de migração ( $v$ , em  $\text{cm/s}$ ) em determinado campo elétrico aplicado ( $E$ , em  $\text{V/cm}$ ), segundo a equação 2 (Zheng *et al.*, 2015):

$$\mu = \frac{v}{E} \quad \text{Equação 2}$$

À semelhança da interpretação feita para a equação 1, a diminuição da mobilidade eletroforética dos conjugados, reflete o aumento da adsorção da proteína de interesse à sua superfície.

Esta variação da mobilidade eletroforética dos conjugados pode, em alguns casos, estar diretamente relacionada com o grau de cobertura da superfície das AuNP, fornecido pela proteína de interesse. Por exemplo, se a solução coloidal for incubada com concentrações crescentes da proteína de interesse, os conjugados resultantes irão apresentar cada vez menor mobilidade eletroforética. Essas mobilidades eletroforéticas podem ser analisadas em função do rácio proteína:AuNP, e esses dados podem ser utilizados quer na otimização da concentração de proteína a utilizar no processo de conjugação, quer na otimização do processo de bloqueamento de quaisquer locais de ligação remanescentes à superfície das AuNP, após conjugação com a proteína de interesse (Franco & Pereira, 2013).

Uma das grandes vantagens desta técnica é que, após a eletroforese, a leitura da migração pode ser feita de imediato, não havendo necessidade de coloração do gel, uma vez que as AuNP fornecem uma coloração vermelha intrínseca às amostras (Hanauer *et al.*, 2007; Zhen *et al.*, 2015). Têm vindo a ser utilizados softwares de processamento de imagens (como o *software* gratuito *eReuss* disponível em <https://github.com/lkrippahl/eReuss>) na medição precisa da migração das bandas de conjugados após EGA, permitindo a aplicação do cálculo preciso da sua mobilidade eletroforética na caracterização de conjugados AuNP-proteína (Guirgis *et al.*, 2012, Cavadas *et al.*, 2016, de Almeida *et al.*, 2018).

### 1.3.5 Aplicação de bioconjugados no diagnóstico clínico

Os dispositivos de detecção baseados em conjugados AuNP-biomolécula têm sido extremamente úteis para o desenvolvimento de biossensores relevantes para o diagnóstico clínico (Wilson, 2008; Baptista *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014).

Numa visão simplificada desses biossensores, o elemento de (bio)reconhecimento é o responsável pela especificidade do sensor, pois são as biomoléculas adsorvidas à superfície das AuNP que irão reagir, especificamente, com o analito de interesse. Já a sensibilidade de detecção do analito, fica a cargo das AuNP e da aplicação das suas propriedades únicas na transdução do sinal (de Almeida *et al.*, 2014).

Dada a variedade de biomoléculas que podem ser utilizadas, os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento de reconhecimento, sendo mais comumente utilizados no diagnóstico clínico: (i) imunossensores para detecção de antígenos e anticorpos (ii); sensores de ácidos nucleicos (DNA/RNA); e (iii) sensores enzimáticos. No que respeita à transdução de sinal, os biossensores podem também ser classificados de acordo com a propriedade físico-química relevante da AuNP como por exemplo: (i) sensores colorimétricos; (ii) sensores baseados em fluorescência; e (iii) sensores eletroquímicos (Baptista *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014).

De entre os biossensores baseados em AuNP, as abordagens colorimétricas têm sido as mais exploradas e, devido à sua simplicidade e portabilidade, são as mais promissoras para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos, económicos e com aplicação “point-of-care” (Wilson, 2008; Baptista *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014).

Como discutido anteriormente, em geral, estes biossensores colorimétricos baseados em AuNP exploram: (i) o fenómeno de agregação das nanopartículas e a consequente deslocação da banda da LSPR destas partículas para comprimentos de onda superiores, levando à mudança de cor da solução coloidal que pode ser detetada visualmente e quantificada por espectrofotometria UV-Vis (Storhoff *et al.*, 2002; Baptista *et al.*, 2005; Liu, Rodriguez & Lee, 2005; Baptista *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006); ou (ii) as propriedades óticas das AuNP que as tornam, por si só, um marcador colorimétrico (Taton, Mirkin & Letsinger, 2000; Glynnou *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2010; Ang *et al.*, 2015). Estes sensores colorimétricos têm as suas principais aplicações no diagnóstico através da detecção de mutações em ácidos nucleicos (Doria *et al.*, 2007), detecção de expressão génica (Baptista *et al.*, 2005), detecção de agentes patogénicos (Baptista *et al.*,

2006), detecção de proteínas (Choi *et al.*, 2010; Ang *et al.*, 2015), e detecção de antígenos/anticorpos (Guirgis *et al.*, 2012; Cavadas *et al.*, 2016), associados a patologias. Como neste trabalho o principal interesse é a aplicação de bioconjugados em imunossensores para detecção colorimétrica de reações antígeno-anticorpo, por forma a criar uma alternativa rápida, sensível e com aplicação “*point-of-care*” ao diagnóstico padrão da PPc, as aplicações deste tipo de sensores serão as mais exploradas nesta secção e seguintes.

Como o desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis é fundamental para o estabelecimento de um diagnóstico clínico baseado na detecção de anticorpos ou antígenos, a maneira mais simples de tirar proveito de bioconjugados em imunoensaios, é utilizando a forte absorção de luz visível por parte das AuNP, aplicando-as simultaneamente como marcadores colorimétricos e como amplificadoras do sinal ótico obtido (Baptista *et al.*, 2011). Alguns exemplos práticos da aplicação de bioconjugados de AuNP em imunossensores óticos para otimização de métodos de diagnóstico tradicionais são:

- I. Adaptação de ensaios imunoenzimáticos tradicionais, através da utilização de conjugados AuNP:anticorpo como potenciadores de sinal. Um exemplo prático é o trabalho de Ambrosi e colaboradores, que adaptaram uma ELISA tradicional para detecção do marcador tumoral CA15.3 (do inglês, *cancer antigen 15.3*), através da utilização de conjugados AuNP-anticorpos anti-CA15.3 marcados com peroxidase, tendo melhorado a sensibilidade da técnica (que possui agora um limite de detecção na gama 0–60 U.mL<sup>-1</sup>) e a rapidez do ensaio tradicional (Ambrosi, Airo & Merkok, 2009);
- II. Desenvolvimento de ensaios “*bio-barcode*”, onde a molécula biológica de interesse é capturada e detetada com base na sua interação específica combinada com nanopartículas magnéticas e AuNP sinalizadoras. Nestes ensaios, as nanopartículas magnéticas permitem a separação e isolamento do analito alvo enquanto que as AuNP conjugadas são usadas para detecção e amplificação do sinal ótico, aumentando a sensibilidade do ensaio (Nam, Thaxton & Mirkin, 2003). Um exemplo clássico da aplicação destes ensaios no diagnóstico clínico é a possibilidade de detecção do antígeno específico da próstata em amostras biológicas, com uma sensibilidade 300 vezes superior à apresentada nos

imunoensaios comerciais disponíveis para a detecção desta biomolécula (Thaxton *et al.*, 2009);

- III. Imunoensaios baseados em técnicas menos comuns de espectroscopia de dispersão de luz também têm produzido resultados promissores em termos de aumento da sensibilidade de detecção do analito de interesse. Exemplos práticos são a utilização de bioconjugados de AuNP em técnicas de espectroscopia de dispersão de luz para detecção de transferrina com limites de detecção que partem de valores tão baixos como 85 pM (Cai *et al.*, 2009); ou a detecção de marcadores tumorais através de conjugados AuNP-anticorpos (Liu *et al.*, 2008);
- IV. Imunoensaios de fluxo lateral, que são imunossensores portáteis e, como tal, com maior aplicação “*point-of-care*”, onde os bioconjugados AuNP-anticorpo ou AuNP-antigénio permitem a leitura da reação antigénio-anticorpo a olho nu. Estes imunossensores serão exhaustivamente discutidos na secção seguinte, por serem os que melhor se adaptam ao pretendido neste trabalho.

## 1.4 Imunonanodiagnóstico: detecção de anticorpos em ensaios de fluxo lateral

A combinação das vantagens das AuNP e da especificidade das biomoléculas, conferem aos bioconjugados AuNP-biomolécula duas grandes aplicações médicas: terapia e diagnóstico, sendo esta última o foco do presente trabalho. O nanodiagnóstico é uma área em crescimento exponencial, que tem contribuído para o surgimento de mais e melhores técnicas para diagnóstico clínico, com aumento da sensibilidade e redução dos custos associados (Jain, 2003; Baptista *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014).

O diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas pode ser realizado usando métodos de cultura, de detecção do microrganismo suspeito ou dos seus antígenos, de detecção de anticorpos gerados em resposta à presença do agente patogénico, ou através da detecção de material genético do agente causador da infeção. Cada uma destas abordagens, meticulosamente detalhadas na secção 2 e 3 deste capítulo, possui pontos fracos no que respeita ao diagnóstico da PPc.

A cultura *in vitro* continua a ser um método de diagnóstico não aplicável à PPc, devido à dificuldade de cultivar *P. jirovecii* de forma reprodutível e duradoura. A detecção do microrganismo por microscopia, está dependente da recolha de amostras respiratórias obtidas por técnicas invasivas e que exigem mão-de-obra especializada. Os métodos de biologia molecular, para além de estarem dependentes de infraestruturas e tecnologias especializadas, podem causar ambiguidade no estabelecimento do diagnóstico, pois não são capazes de distinguir infeção ativa de colonização por *P. jirovecii*. Por fim, a pesquisa de anticorpos anti-*P. jirovecii* começou a ser feita em amostras de soro com recurso a antígenos recombinantes deste microrganismo, mas até à data não existe qualquer método serológico que permita o diagnóstico sensível, específico e precoce da PPc (Tomás & Matos, 2018).

Contudo, a pesquisa de anticorpos anti-*P. jirovecii* em soro continua a ser uma abordagem atrativa e ainda pouco explorada no estabelecimento do diagnóstico da PPc. Uma vez que a detecção de biomoléculas em amostras biológicas se torna mais rápida, mais sensível e mais flexível quando nanopartículas são utilizadas como ferramentas de detecção (Baptista *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2014), neste trabalho,

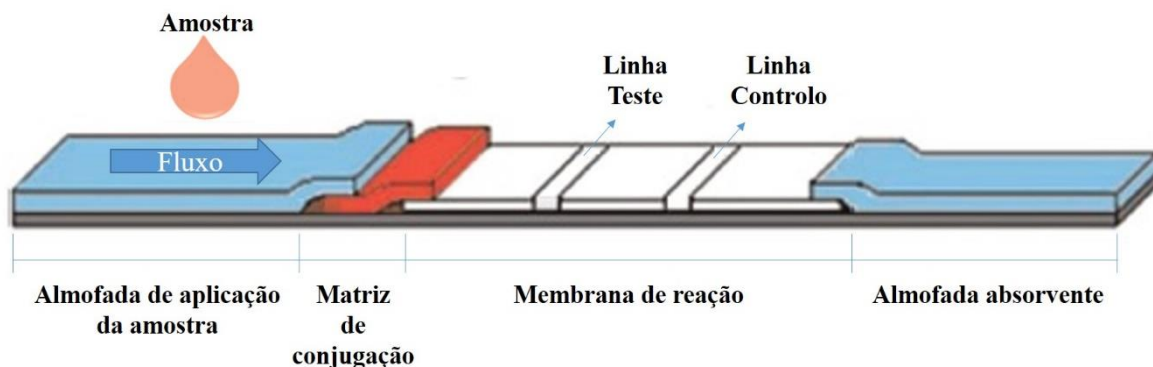
a sua utilização foi explorada no desenvolvimento de ensaios de fluxo lateral para detecção de anticorpos anti-*P. jirovecii* (Tomás *et al.*, 2019).

#### 1.4.1 Ensaios de fluxo lateral: composição e formatos

Os ensaios de fluxo lateral (LFA, do inglês *lateral flow assays*), também designados testes de tira, são uma plataforma baseada em papel para a detecção e/ou quantificação de analitos em misturas complexas, onde a amostra é colocada num dispositivo de teste e os resultados são obtidos em minutos (O'Farrell, 2013; Sajid, Kawde & Daud, 2014; Koczula & Gallotta, 2016). O seu baixo custo de produção, facilidade de utilização e portabilidade, resultaram na expansão das suas aplicações no diagnóstico clínico. Apesar da sua principal e mais conhecida aplicação continuar a ser os típicos testes de gravidez, os LFA são atualmente amplamente utilizados na prática clínica para a detecção de uma vasta gama de analitos (antigénios, anticorpos, fármacos, hormonas, entre outras) em várias amostras biológicas, incluindo urina (Magambo *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2017), saliva (Carrio *et al.*, 2015; Apilux *et al.*, 2018), soro (Magambo *et al.*, 2014), plasma (Schramm *et al.*, 2015), sangue total (Ang *et al.*, 2015; Schramm *et al.*, 2015), entre outras. Além disso, devido à sua durabilidade e armazenamento independente de refrigeração, estes testes estão muito bem adaptados para uso em ambulatório (aplicação *point-of-care*) e em regiões com recursos escassos ou remotas.

A tecnologia dos LFA está dependente do tipo de leitura que se pretende: leitura ótica ou leitura eletroquímica. Como os LFA tendem a ser mais comumente utilizados para análises qualitativas do que quantitativas, os métodos que permitem uma leitura ótica, preferencialmente independente de equipamentos, são geralmente os de eleição (O'Farrell, 2013; Sajid, Kawde & Daud, 2014; Koczula & Gallotta, 2016).

Embora existam variações da tecnologia, todos os LFA operam usando o mesmo conceito básico: uma amostra líquida contendo o analito de interesse migra ao longo da tira por capilaridade, passando por várias zonas nas quais moléculas que podem interagir com o analito de interesse estão presentes. Para esse efeito, os testes de tira são compostos pela sobreposição de materiais e montadas num suporte de apoio (normalmente plástico), que garante a estabilidade e o manuseio do teste (O'Farrell, 2013; Sajid, Kawde & Daud, 2014; Koczula & Gallotta, 2016). A composição geral de um LFA está ilustrada na figura 12.



**Figura 12.** Esquema ilustrativo geral da composição de um LFA (adaptado de Quesada-González & Merkoçi, 2015).

A zona de aplicação da amostra é uma zona absorvente, sobre a qual a amostra em estudo é aplicada sobre uma malha de tecido ou fibra de celulose. A sua função principal é promover a distribuição uniforme e controlada da amostra, pelo que deve exibir espessura e densidade consistentes, de modo a que as taxas de absorção sejam uniformes, garantindo a reprodutibilidade do ensaio. Esta zona deve também apresentar baixa afinidade de ligação ao analito de interesse, para evitar a sua adsorção nesta almofada. Para tal, este componente do teste pode ser alvo de pré-tratamento com proteínas, detergentes ou sais, por forma a reduzir as ligações não específicas, aumentar a viscosidade ou alterar o pH da amostra (O’Farrell, 2013; Koczula & Gallotta, 2016).

A matriz de conjugação é uma zona composta, tipicamente, por fibra de vidro, na qual o reagente de deteção (normalmente AuNP ou partículas de látex) foi imobilizado e seco. Após a saturação da almofada de aplicação da amostra, a amostra flui para esta matriz e o reagente de deteção é re-hidratado e libertado, migrando juntamente com a amostra em direção à membrana de reação. As funções principais desta matriz são preservar a estabilidade das partículas de deteção após secagem e assegurar a transferência uniforme da amostra e do reagente de deteção para a membrana de reação, após re-hidratação (O’Farrell, 2013; Koczula & Gallotta, 2016). Assim, a sua otimização deve ser feita de forma a evitar a ligação não específica do reagente de deteção e/ou do analito à matriz, podendo ser necessário um pré-tratamento com carboidratos (tais como sacarose), que funcionam como agentes de conservação e de re-solubilização (Anon, 2008). Quando a amostra entra na matriz de conjugação, as moléculas de açúcar que



rodeiam e estabilizam o reagente de detecção dissolvem-se rapidamente, favorecendo a ressolubilização deste reagente e a sua migração com a amostra (Anon, 2008).

A membrana de reação é considerada o elemento mais importante no desenvolvimento de um LFA. A nitrocelulose é o material mais comumente utilizado, e as suas membranas podem ser apresentadas por gama de poros com diferentes tamanhos ou por gama de tempos de fluxo capilar. O tempo de fluxo capilar é tipicamente expresso em segundos por centímetro ( $\text{s.cm}^{-1}$ ) e é definido como o tempo que o líquido da amostra demora a percorrer e preencher completamente a membrana de reação. Quer o tamanho do poro utilizado quer o tempo de fluxo capilar, podem afetar a sensibilidade e especificidade do imunoensaio de fluxo lateral, bem como a consistência da linha de teste, pelo que a sua seleção deve ser criteriosa (O'Farrell, 2013). Como os poros não são distribuídos igualmente ao longo da membrana, devido ao processo de fabrico, o tempo de fluxo capilar é normalmente recomendado como o parâmetro a usar na seleção final da membrana do ensaio de fluxo lateral (Koczula & Gallotta, 2016). A seleção e adsorção dos reagentes de captura e de controlo, nas linhas teste e controlo, respetivamente, devem também ser otimizadas para cada ensaio, pois controlarão grande parte da sua eficiência. Normalmente, na linha teste é depositado um reagente de captura capaz de reagir com o analito em estudo e na linha controlo é depositado um reagente de captura capaz de capturar o reagente de conjugação para assegurar a validade do ensaio. Para padronização, é normalmente necessário recorrer a instrumentos especializados para uma aplicação precisa destes reagentes nas respetivas linhas, criando zonas de teste e controlo bem definidas. A leitura, representada pelas linhas coloridas que aparecem com diferentes intensidades, pode ser avaliada a olho nu ou usando um leitor ótico (O'Farrell, 2013; Sajid, Kawde & Daud, 2014; Koczula & Gallotta, 2016).

Por fim, a almofada absorvente, tipicamente composta por um filtro de celulose, é o último componente do teste de tira com o qual a amostra entra em contacto. Este absorvente tem a função de aumentar o volume de amostra que pode ser analisada no teste de tira e evita o seu refluxo. O aumento do volume de amostra testado é útil para a sensibilidade do ensaio, uma vez que aumenta a quantidade de analito que passa pela membrana de reação e, ao mesmo tempo, diminui o ruído de fundo do teste, ao aumentar a lavagem do reagente de detecção em excesso. Para tal, a espessura deste absorvente deve ser otimizada para cada ensaio. (O'Farrell, 2013; Koczula & Gallotta, 2016).

Existem dois tipos de formato de LFA: direto e competitivo. Um teste direto é usado para detetar analitos com peso molecular elevado e com múltiplos determinantes antigénicos disponíveis (Butler, Khanlian & Cole, 2001; Workman *et al.*, 2009). No caso de pequenas moléculas com determinantes antigénicos únicos, incapazes de se ligarem a mais do que um reagente de captura, são aplicados testes competitivos (Apilux *et al.*, 2018). Assim, num teste direto, a presença da linha de teste indica um resultado positivo e a presença da linha de controlo confirma, geralmente, que a amostra e o reagente de conjugação migraram de forma adequada através do dispositivo. Num ensaio competitivo, a ligação do reagente de conjugação ao analito bloqueia a sua interação com o reagente de captura na linha teste, pelo que um resultado positivo é indicado pela falta de sinal na linha de teste, enquanto a linha de controlo deve ser sempre visível, independentemente do resultado do teste (Sajid, Kawde & Daud, 2014; Koczula & Gallotta, 2016).

De entre cada um destes ensaios, existem esquemas mais ou menos tradicionais que variam consoante o analito a pesquisar, o tipo de conjugado e o reagente de captura utilizados (Aveyard, Nolan & Wilsom, 2008; Sotnikov, Zherdev & Dzantiev, 2018).

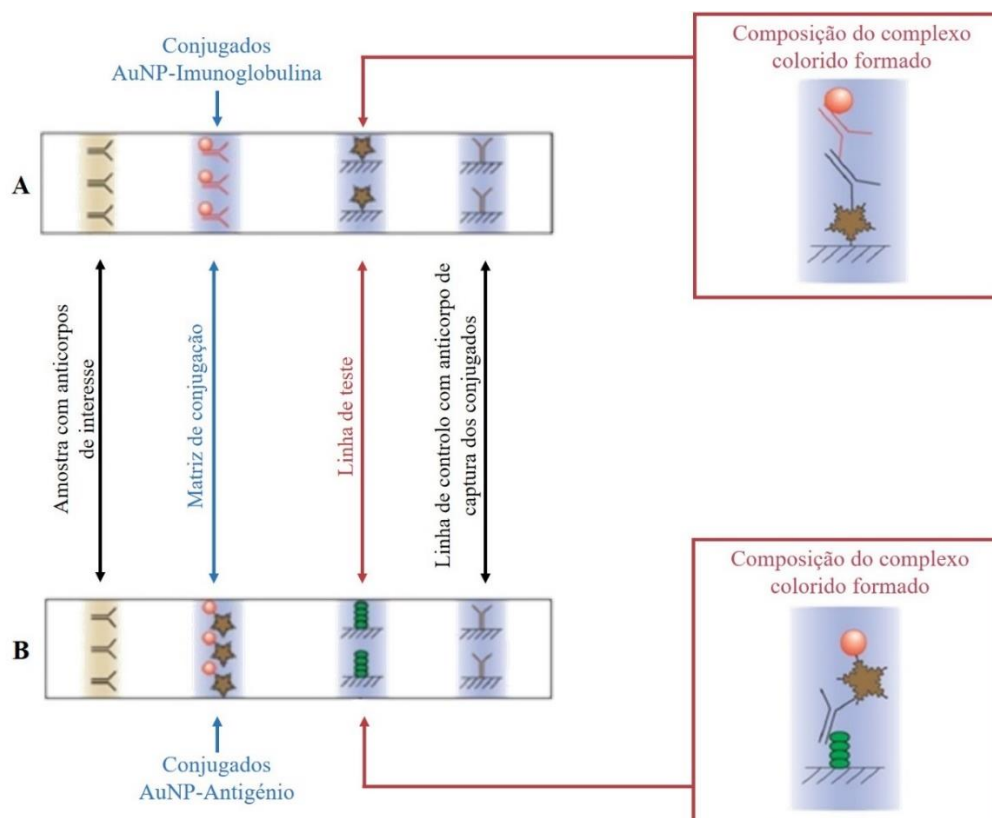
Ensaio de fluxo lateral diretos, aplicados à deteção de anticorpos séricos, como os desenvolvidos neste trabalho, possuem maioritariamente o formato apresentado na figura 13A. Neste formato, os testes são desenvolvidos com base na utilização de reagentes de coloração (normalmente AuNP) conjugados com imunoglobulinas ou proteínas de captura de imunoglobulinas, capazes de reagir com os anticorpos circulantes da amostra. Assim, após aplicação da amostra, os anticorpos que se pretendem detetar que tenham sido capturados pelos conjugados migram ao longo da membrana e ficam retidos na linha de teste, através da sua reação com antígenos específicos imobilizados nesta zona analítica, formando um complexo colorido (Nakano *et al.*, 2015; Sotnikov *et al.*, 2015a; Janwan *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2016).

Um esquema alternativo, muito menos descrito na literatura, está representado na figura 13B. Neste formato, os reagentes de coloração são conjugados com antígenos específicos, que permitem a captura direcionada dos anticorpos circulantes a detetar na amostra biológica. Assim, na linha de teste são imobilizadas imunoglobulinas ou proteínas de captura das imunoglobulinas de interesse, que permitem a captura dos

conjugados e respetivos anticorpos adsovidos, com a consequente formação de um complexo colorido nesta zona analítica (Sotnikov *et al.*, 2015b).

Alguns autores demonstraram que este formato alternativo promove um aumento da sensibilidade analítica até 50% (Sotnikov *et al.*, 2015b). Tal é explicado pelo facto de, no caso do esquema tradicional (figura 13A), todas as imunoglobulinas presentes na amostra serem capazes de reagir com os conjugados, deixando poucos espaços livres para a ligação dos anticorpos específicos contra o antigénio de interesse. Assim, esta competição (maior em amostras com baixa concentração de anticorpos específicos contra o agente infeccioso) limita substancialmente a captura dos conjugados na zona de teste, resultando numa diminuição na sensibilidade do teste e, consequentemente, num aumento no número de resultados falso-negativos. No esquema alternativo (figura 13B), como um antigénio do agente infeccioso é conjugado com a AuNP, apenas anticorpos específicos se ligam ao conjugado no primeiro passo do ensaio, evitando competição com outras imunoglobulinas inespecíficas. Tal proporciona um maior conteúdo de anticorpos específicos no complexo formado e, consequentemente, um aumento da captura dos conjugados na zona teste, com aumento da sensibilidade do ensaio.

Por esta razão, este esquema alternativo poderá ser uma boa abordagem no desenvolvimento de testes de diagnóstico serológicos mais sensíveis.



**Figura 13.** Esquema ilustrativo do formato tradicional (A) e de um formato alternativo (B) de imunoenaios de fluxo lateral para pesquisa de anticorpos na amostra em estudo. No formato tradicional, o complexo colorido formado na linha teste é composto pelos antígenos de captura, os anticorpos de interesse e os conjugados AuNP-Imunoglobulina. No formato alternativo, o complexo colorido formado na linha teste é composto pelas imunoglobulinas/proteínas de captura, pelos anticorpos de interesse e pelos conjugados AuNP-Antígeno. (adaptade de Sotnikov, Zherdev & Dzantiev, 2018).

#### 1.4.2 Aplicação de AuNP em imunoenaios de fluxo lateral: exemplo prático do imunonanodiagnóstico da PPc

A combinação do conceito dos LFA com a utilização de nanopartículas como ferramentas de detecção, tem tornado estes testes ótimos instrumentos de diagnóstico (Chun, 2008; Baptista *et al.*, 2011; Quesada-González & Merkoçi, 2015). Atualmente, o ouro coloidal é o reagente de detecção mais amplamente utilizado nos LFA comerciais (Chandler, Gurmin & Robinson, 2000; Chun, 2008; Baptista *et al.*, 2011; Quesada-González & Merkoçi, 2015). As razões que sustentam esta sua ampla utilização, baseiam-se nas características únicas das AuNP, discutidas na secção 4 deste capítulo, que as

tornam ferramentas de detecção ótica que garantem a eficiência e aplicabilidade dos LFA em diagnóstico clínico. A portabilidade destes testes, e consequente possibilidade de os executar em ambiente de ambulatorio e/ou em áreas remotas, é assegurada pela estabilidade destas partículas. Já a elevada sensibilidade e especificidade destes ensaios, é assegurada pela bioconjugação das AuNP a biomoléculas que produzem reações específicas com o analito em estudo. A reprodutibilidade destes testes tem de ser assegurada, e tal é possível através da uniformização da produção dos bioconjugados através da possibilidade de síntese de AuNP sempre com as mesmas características. A aplicação e interpretação destes LFA em ambulatorio, é assegurada pela cor intensa das AuNP, capaz de produzir um resultado colorimétrico rápido e independente de instrumentos de leitura. Por fim, o baixo custo da produção do teste e a consequente possibilidade de o tornar economicamente acessível, é assegurado pela facilidade e baixo custo de produção destas ferramentas de detecção (Chandler, Gurmin & Robinson, 2000; Chun, 2008; Baptista *et al.*, 2011; O'Farrell, 2013; Quesada-González & Merkoçi, 2015).

Assim, tendo em conta as potencialidades da aplicação de AuNP no desenvolvimento de imunoensaios de fluxo lateral para diagnóstico clínico, nasceu a ideia de se desenvolver um LFA para o diagnóstico da PPc. Esta abordagem, explorada neste trabalho, baseou-se na conjugação da tecnologia de produção de antígenos recombinantes de *P. jirovecii*, com as extraordinárias propriedades das AuNP, para detecção de anticorpos circulantes específicos contra *P. jirovecii* em amostras de soro de doentes. Para isso, dois antígenos recombinantes sintéticos (ARS) multi-epítopo específicos de *P. jirovecii* foram produzidos e conjugados com AuNP esféricas (de acordo com o esquema alternativo dos LFA exposto na figura 13B), aplicando esses conjugados como ferramentas de detecção de anticorpos reativos contra *P. jirovecii*, nos LFA desenvolvidos (Tomás *et al.*, 2019). Esta abordagem procura oferecer uma alternativa de diagnóstico da PPc, proporcionando um teste de detecção da infeção por *P. jirovecii* rápido e precoce, com recurso a uma amostra biológica obtida de forma menos invasiva (sangue venoso) do que as utilizadas no diagnóstico clássico da PPc.

## 1.5 Objetivos da presente dissertação

No contexto da necessidade de se desenvolverem alternativas ao diagnóstico clássico da PPc que permitam a utilização de amostras biológicas obtidas de forma minimamente invasiva, este trabalho teve como objetivos gerais:

1. validar o potencial de antígenos recombinantes sintéticos de *P. jirovecii* como biomarcadores da infecção por *P. jirovecii*;
2. aplicar antígenos recombinantes sintéticos de *P. jirovecii* na detecção de anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii* em amostras de soro de doentes;
3. conjugar antígenos recombinantes sintéticos de *P. jirovecii* a nanopartículas de ouro, tendo por base o desenvolvimento de um imunoensaio de fluxo lateral para o diagnóstico de PPc.

Para tal, este trabalho teve como objetivos específicos:

- i) produzir e purificar antígenos recombinantes sintéticos multi-epítopo específicos de *P. jirovecii*, tendo por base as propriedades antigénicas das suas glicoproteínas major de superfície (Msg) e da sua protease de serina Kex1;
- ii) aplicar estes antígenos na detecção de anticorpos anti-*P. jirovecii* da classe IgG e IgM, em soros de doentes provenientes de grupos clínicos distintos, por técnica de ELISA;
- iii) definir os níveis e as classes de anticorpos anti-*P. jirovecii* com aplicação no diagnóstico da PPc;
- iv) conjugar os antígenos recombinantes sintéticos de *P. jirovecii* produzidos a nanopartículas de ouro, criando bioconjugados estáveis reconhecidos pelos anticorpos anti-*P. jirovecii* presentes no soro dos doentes;
- v) otimizar os bioconjugados a aplicar no desenvolvimento de um imunoensaio de fluxo lateral para diagnóstico *point-of-care* da PPc.

## 1.6 Referências

- ALIOUAT-DENIS, C.M., MARTINEZ, A., ALIOUAT et M., POTTIER, M., GANTOIS, N. & DEI-CAS, E. (2009) The *Pneumocystis* life cycle. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104 (3). p. 419-426.
- ALIOUAT, E. M., MAZARS, E., DEI-CAS, E., DELCOURT, P., BILLAUT, P., & CAMUS, D. (1994). *Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 41(5). p. 71S.
- AMBROSI, A., AIRO, F., & MERKOÇI, A. (2009). Enhanced gold nanoparticle based ELISA for a breast cancer biomarker. *Analytical chemistry*. 82(3). p. 1151-1156.
- ANG, S.H., RAMBELI, M., THEVARAJAH, T.M., ALIAS, Y.B. AND KHOR, S.M. (2015) Quantitative, single-step dual measurement of hemoglobin A1c and total hemoglobin in human whole blood using a gold sandwich immunochromatographic assay for personalized medicine. *Biosensors and Bioelectronics*. 78. p.187–193.
- ANON (2008) Rapid Lateral Flow Test Strips: Considerations for Product Development, Merck Millipore, Billerica.
- APILUX, A., RENGPIPAT, S., SUWANJANG, W., & CHAILAPAKUL, O. (2018) Development of competitive lateral flow immunoassay coupled with silver enhancement for simple and sensitive salivary cortisol detection. *EXCLI jornal*. 17. p. 1198.
- ARMSTRONG, J. D., MEINTJES, G., & BROWN, G. D. (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in microbiology*. 22(3). p. 120-127.
- ATZORI, C., AGOSTONI, F., ANGELI, E., MAININI, A., MICHELI, V., & CARGNEL, A. (1999). *P. carinii* host specificity: attempt of cross infections with human derived strains in rats. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 46(5). p. 112S-112S.
- ATZORI, C., LU, J. J., JIANG, B., BARTLETT, M. S., ORLANDO, G., QUEENER, S. F., SMITH, J. W., CARGNEL, A., & LEE, C. H. (1995). Diagnosis of

*Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients by using polymerase chain reactions on serum specimens. *Journal of Infectious Diseases*. 172(6). p. 1623-1626.

ATZORI, C., MAININI, A., AGOSTONI, F., ANGELI, E., BARTLETT, M., BRUNO, A., SCAGLIA, M., & CARGNEL, A. (1999). Detection of rat *Pneumocystis carinii* proteinases and elastase and anti*Pneumocystis* activity of proteinase inhibitors in vitro. *Parasite*. 6(1). p. 9-16.

AVEYARD, J., NOLAN, P., & WILSON, R. (2008). Improving the sensitivity of immunoassays by tuning gold nanoparticles to the tipping point. *Analytical chemistry*. 80(15). p. 6001-6005.

AVINO, L. J., NAYLOR, S. M., & ROECKER, A. M. (2016). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in the Non-HIV-Infected population. *Annals of Pharmacotherapy*. 50(8). p. 673-679.

BALDAUF, S. L., & PALMER, J. D. (1993). Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(24). p. 11558-11562.

BAPTISTA, P., DORIA, G., HENRIQUES, D., PEREIRA, E., & FRANCO, R. (2005). Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of biotechnology*. 119(2). p. 111-117.

BAPTISTA, P. V., DORIA, G., QUARESMA, P., CAVADAS, M., NEVES, C. S., GOMES, I., EATON, P., PEREIRA, E., & FRANCO, R. (2011). Nanoparticles in molecular diagnostics. In: Villaverde, A. (ed.) Progress in molecular biology and translational science. Volume 104, p(427-488). Academic Press.

BAPTISTA, P. V., KOZIOL-MONTEWKA, M., PALUCH-OLEN, J., DORIA, G., & FRANCO, R. (2006). Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples. *Clinical chemistry*. 52(7). p. 1433-1434.

BAPTISTA, P., PEREIRA, E., EATON, P., DORIA, G., MIRANDA, A., GOMES, I., QUARESMA, P. FRANCO, R. (2008). Gold nanoparticles for the development of



clinical diagnosis methods. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 391(3). p.943-950.

BARRY, J. D., GINGER, M. L., BURTON, P., & MCCULLOCH, R. (2003). Why are parasite contingency genes often associated with telomeres?. *International journal for parasitology*. 33(1). p. 29-45.

BARRY, S.M. & JOHNSON, M.A. (2001) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. *HIV medicine*. 2 (2). p. 123-132.

BARTLETT, M. S., EICHHOLTZ, R., & SMITH, J. W. (1985). Antimicrobial susceptibility of *Pneumocystis carinii* in culture. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 3(5). p. 381-387.

BARTLETT, M. S., LEE, C. H., LU, J. J., BAUER, N. L., BETTZ, J. F., MCLAUGHLIN, G. L., & SMITH, J. W. (1994a). *Pneumocystis carinii* detected in air. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 41(5). p. 75S.

BARTLETT, M. S., QUEENER, S. F., SHAW, M. M., RICHARDSON, J. D., & SMITH, J. W. (1994b). *Pneumocystis carinii* is resistant to imidazole antifungal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 38(8). p. 1859-1861.

BARTLETT, M. S., VERMUND, S. H., JACOBS, R., DURANT, P. J., SHAW, M. M., SMITH, J. W., TANG, X., LU, J. J., LI, B., JIN, S., LEE, C. H. (1997). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *Journal of clinical microbiology*. 35(10). p. 2511-2513.

BASTÚS, N.G., COMENGE, J., & PUNTES, V. (2011) Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir*. 27. p. 11098-105.

BAUGHMAN, R.P., DOHN, M.N., & FRAME, P.T. (1994) The continuing utility of bronchoalveolar lavage to diagnose opportunistic infection in AIDS patients. *The American journal of medicine*. 97. p. 515-522.

BAUGHMAN, R.P., STROHOPER, S.S., CLINTON, B.A., NICKOL, A.D., FRAME, P.I. (1989) The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting

*Pneumocystis carinii*. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 113. p. 1062-1065.

BEARD, C. B., FOX, M. R., LAWRENCE, G. G., GUARNER, J., HANZLICK, R. L., HUANG, L., DEL RIO, C., RIMLAND, D., DUCHIN, J. S., & COLLEY, D. G. (2005). Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: epidemiological implications. *The Journal of infectious diseases*. 192(10). p. 1815-1818.

BECK, J. M., & HARMSSEN, A. G. (1998). Lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii*. In *Seminars in respiratory infections*, 13(4). p. 330-338.

BECK, J. M., NEWBURY, R. L., PALMER, B. E., WARNOCK, M. L., BYRD, P. K., & KALTREIDER, H. B. (1996). Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 128(5). p. 477-487.

BECK, J. M., WARNOCK, M. L., CURTIS, J. L., SNIEZEK, M. J., ARRAJ-PEFFER, S. M., KALTREIDER, H. B., & SHELLITO, J. E. (1991). Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology* 5. p. 186-197.

BIENVENU, A.L.; TRAORE, K.; PLEKHANOVA, I.; BOUCHRIK, M.; BOSSARD, C.; & PICOT, S. (2016) *Pneumocystis* pneumonia suspected cases in 604 non-HIV and HIV patients. *International Journal of Infectious Diseases*. 46. p. 11–17.

BISHOP, L.R. & KOVACS, J.A. (2003) Quantitation of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in healthy persons and immunocompromised patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 187. p. 1844-1848.

BLOUNT, R.J., JARLSBERG, L.G., DALY, K.R., WORODRIA, W., DAVIS, J.L., CATTAMANCHI, A., DJAWE, K., ANDAMA, A., KOCH, J., WALZER, P.D. & HUANG, L. (2012) Serologic responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major

surface glycoprotein among Uganda patients with respiratory symptoms. *PLoS One*. 7 (12).

BOLAT, G., KURALAY, F., EROGLU, G. & ABACI, S. (2013) Fabrication of a polyaniline ultramicroelectrode via a self assembled monolayer modified gold electrode. *Sensors (Basel)*. 13. p. 8079–8094.

BONGOMIN, F., GAGO, S., OLADELE, R., & DENNING, D. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of fungi*. 3(4). p. 57.

BREITE, M., BAILEY, A.M., MARTIN, W.J. (1993) *Pneumocystis carinii* chymase is capable of altering epithelial cell permeability. *American Review of Respiratory Disease* 147(4). p. A33.

BROWN, G. D., & GORDON, S. (2005). Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. *Cellular microbiology*. 7(4). p. 471-479.

BROWN, G. D., DENNING, D. W., GOW, N. A., LEVITZ, S. M., NETEA, M. G., & WHITE, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*. 4(165). 165rv13-165rv13.

BRUST, M., WALKER, M., BETHELL, D., SCHIFFRIN, D. J., & WHYMAN, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. (7). p. 801-802.

BUTLER, S.A., KHANLIAN, S.A. AND COLE, L.A. (2001) Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices. *Clinical Chemistry*. 47. p. 2131–2136.

CALDERÓN, E.J., GUTIÉRREZ-RIVERO, S., DURAND-JOLY, I. & DEI-CAS, E. (2010) *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert review of anti-infective therapy*. 8 (6). p. 683-701.

CAI, H. H., YANG, P. H., FENG, J., & CAI, J. (2009). Immunoassay detection using functionalized gold nanoparticle probes coupled with resonance Rayleigh scattering. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 135(2). p. 603-609.

CAO, X., YE, Y., & LIU, S. (2011). Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Analytical biochemistry*. 417(1). p. 1-16.

CARINI, A. (1910) Formas de eschizogomia do *Trypanossoma lewisi*. *Boletim da sociedade de medicina e cirurgia de São Paulo*. 18(8). p. 204

CARRIO, A., SAMPEDRO, C., SANCHEZ-LOPEZ, J.L., PIMIENTA, M. AND CAMPOY, P. (2015) Automated low-cost smartphone-based lateral flow saliva test reader for drugs-of-abuse detection. *Sensors* 15. p. 29569–29593.

CAVADAS, M. A. S., MONOPOLI, M. P., CUNHA, C. S. E., PRUDÊNCIO, M., PEREIRA, E., LYNCH, I., KENNETH, A. D., & FRANCO, R. (2016). Unravelling Malaria Antigen Binding to Antibody-Gold Nanoparticle Conjugates. *Particle & Particle Systems Characterization*. 33(12). p. 906-915.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (1982) A cluster of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* 31. p. 305–307.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (1989). Guidelines for prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia for persons infected with human immunodeficiency virus. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 38(Suppl 5). p. 1-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2524643> [acedido a 22 Julho 2019].

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2019). “*Pneumocystis*” [Online] Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/Pneumocystis/index.html> [acedido a 7 Junho 2019].

CHABÉ, M., DEI-CAS, E., CREUSY, C., FLEURISSE, L., RESPALDIZA, N., CAMUS, D., & DURAND-JOLY, I. (2004). Immunocompetent hosts as a reservoir

of *Pneumocystis* organisms: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 23(2). p. 89-97.

CHAGAS, C. (1909). Nova tripanozomiaza humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1. p. 159-218.

CHANDLER, J., GURMIN, T., & ROBINSON, N. (2000). The place of gold in rapid tests. *IVD technology*. 6(2). p. 37-49.

CHATTERTON, J. M., JOSS, A. W. L., PENNINGTON, T. H., & HO-YEN, D. O. (1999). Usefulness of rat-derived antigen in the serodiagnosis of *Pneumocystis carinii* infection. *Journal of medical microbiology*. 48(7). p. 681-687.

CHOI, M. H., CHUNG, B. S., CHUNG, Y. B., YU, J. R., CHO, S. R., & HONG, S. T. (2000). Purification of a 68-kDa cysteine proteinase from crude extract of *Pneumocystis carinii*. *The Korean journal of parasitology*. 38(3). p. 159.

CHOI, D. H., LEE, S. K., OH, Y. K., BAE, B. W., LEE, S. D., KIM, S., Shin, Y-B., & KIM, M. G. (2010). A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I. *Biosensors and Bioelectronics*. 25(8). p. 1999-2002.

CHOUKRI, F., MENOTTI, J., SARFATI, C., LUCET, J. C., NEVEZ, G., GARIN, Y. J., & TOTET, A. (2010). Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clinical infectious diseases*. 51(3). p. 259-265.

CHUN, P. (2008) Colloidal gold and other labels for lateral flow immunoassays In: Systems In: Wong, R. & Tse, H. (eds.) Lateral flow immunoassay. p(75-94). Springer Science & Business Media.

CISSÉ, O. H., PAGNI, M., & HAUSER, P. M. (2012). De novo assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. *MBio*. 4(1). e00428-12.

CISSÉ, O. H., PAGNI, M., & HAUSER, P. M. (2014). Comparative genomics suggests that the human pathogenic fungus *Pneumocystis jirovecii* acquired obligate biotrophy through gene loss. *Genome biology and evolution*. 6(8). p. 1938-1948.

COBLEY, C. M., CHEN, J., CHO, E. C., WANG, L. V & XIA, Y. (2011) Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*. 40. p. 44–56.

CONDE, J., DIAS, J. T., GRAZÚ, V., MOROS, M., BAPTISTA, P. V., & DE LA FUENTE, J. M. (2014). Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in chemistry*. 2. p. 48.

COOLEY, L., DENDLE, C., WOLF, J., TEH, B. W., CHEN, S. C., BOUTLIS, C., & THURSKY, K. A. (2014). Consensus guidelines for diagnosis, prophylaxis and management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014. *Internal medicine journal*. 44(12b). p. 1350-1363.

CORDEIRO, M., FERREIRA, C. F., PEDROSA, P., LOPEZ, A., & BAPTISTA, P. (2016). Gold nanoparticles for diagnostics: advances towards points of care. *Diagnostics*. 6(4), p.43.

CUSHION, M. T., CHEN, F., & KLOEPFER, N. (1997). A cytotoxicity assay for evaluation of candidate anti-*Pneumocystis carinii* agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 41(2). p. 379-384.

CUSHION, M. T., KEELY, S. P., & STRINGER, J. R. (2004). Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. *Mycologia*. 96(3). p. 429-438.

CUSHION, M. T., LINKE, M. J., ASHBAUGH, A., SESTERHENN, T., COLLINS, M. S., LYNCH, K., BRUBAKER, R., & WALZER, P. D. (2010). Echinocandin treatment of *Pneumocystis* pneumonia in rodent models depletes cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection. *PloS one*. 5(1). e8524.

DAI, J. F., JIANG, M., QU, L. L., SUN, L., WANG, Y. Y., GONG, L. L., GONG, R. J., & SI, J. (2013). *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant multi-epitope peptide for distinguishing recent from past infection in human sera. *Experimental parasitology*. 133(1). p. 95-100.

DAI, J., JIANG, M., WANG, Y., QU, L. & SI, J. (2012) Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical and vaccine immunology*. 19 (3). p. 338-342.

DALY, R.K., FICHTENBAUM, C.J., TANAKA, R., LINKE, M.J., O'BERT, R.THULLEN, M.S., HUI, M.S., SMULLIAN, A.G. & WALZER, P.D. (2002) Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jiroveci* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons. *The journal of infectious diseases*. 186 (5). p. 644-651.

DALY, R.K., KOCH, J., LEVIN, L. & WALZER, P.D. (2004) Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jiroveci*. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (5). p. 848-854.

DALY, R.K., KOCH, J., RESPALDIZA, N., de la HORRA, C., MONTES-CANO, M.A., VARELA, J.M., CALDERON, E.J. & WALZER, P.D. (2009) Geographical variation in serological responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein antigens. *Clinical microbiology and infection*. 15 (10). p. 937-942.

DALY, R.K., KOCH, J.V., SHIRE, N.J., LEVIN, L. & WALZER, P.D. (2006) Human immunodeficiency virus-infected patients with prior *Pneumocystis pneumonia* exhibit increased serologic reactivity to several major surface glycoprotein clones. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13 (10). p. 1071-1078.

DAMIANI, C., CHOUKRI, F., LE GAL, S., MENOTTI, J., SARFATI, C., NEVEZ, G., DEROUIN, F., & TOTET, A. (2012). Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging infectious diseases*. 18(5). p. 877.

DAMIANI, C., LE GAL, S., DA COSTA, C., VIRMAUX, M., NEVEZ, G., TOTET, A. (2013) Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1->3)- $\beta$ -D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. *Journal of Clinical Microbiology*. 51. p. 3380-3388.

DANIEL, M. C., & ASTRUC, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*. 104(1). p. 293-346.

de ALMEIDA, M. P., PEREIRA, E., BAPTISTA, P., GOMES, I., FIGUEIREDO, S., SOARES, L., & FRANCO, R. (2014). Gold Nanoparticles as (Bio) Chemical Sensors. In: Valcárcel, M. & López-Lorente, A. I. (eds.) *Comprehensive Analytical Chemistry*. Volume 66, p(529-567). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

de ALMEIDA, M. P., QUARESMA, P., SOUSA, S., COUTO, C., GOMES, I., KRIPPAHL, L., FRANCO, R., & PEREIRA, E. (2018). Measurement of adsorption constants of laccase on gold nanoparticles to evaluate the enhancement in enzyme activity of adsorbed laccase. *Physysical Chemistry Chemical Physics* 20(24). p. 16761-16769.

de BOER, M. G., de FIJTER, J. W., & KROON, F. P. (2011). Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. *Medical mycology*. 49(7). p. 673-680.

de BOER, M.G., GELINCK, L.B., VAN ZELST, B.D., VAN DE SANDE, W.W., WILLEMS, L.N., VAN DISSEL, J.T., DE JONGE, R., KROON, F.P. (2011)  $\beta$ -D-glucan and S-adenosylmethionine serum levels for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-negative patients: a prospective study. *Journal of Infection*. 62: p. 93-100.

DEI-CAS, E., CHABE, M., MOUKHLIS, R., DURAND-JOLY, I., ALIOUAT, E. M., STRINGER, J. R., CUSHION, M., NOEL, C., DE HOOG, G. S., GUILLOT, J., VISCOGLIOSI, E. (2006). *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and



description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. *FEMS microbiology reviews*. 30(6). p. 853-871.

DEITSCH, K. W., LUKEHART, S. A., & STRINGER, J. R. (2009). Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 7(7). 493.

DELANOË, P. & DELANOË, M. (1912). Sur les rapports des kystes de *Carini* du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. *CR Acad. Sci. Paris*. 155. p. 658-660.

DJAWE, K., DALY, K.R., LEVIN, L., ZAR, H.J. & WALZER, P.D. (2013) Humoral immune responses to *Pneumocystis jirovecii* antigens in HIV-infected and uninfected young children with *Pneumocystis* Pneumonia. *PLoS One*. 8 (12).

DJAWE, K., HUANG, L., DALY, K.R., LEVIN, L., KOCH, J., SCHWARTZMAN, A., FONG, S., ROTH, B., SUBRAMANIAN, A., GRIECO, K., JARLSBERG, L. & WALZER, P.D. (2010) Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. *PLoS One*. 5 (12).

DOHN, M. N., WHITE, M. L., VIGDORTH, E. M., RALPH BUNCHER, C., HERTZBERG, V. S., BAUGHMAN, R. P., SMULIAN, G., & WALZER, P. D. (2000). Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 162(5). p. 1617-1621.

DORIA, G., FRANCO, R., & BAPTISTA, P. (2007). Nanodiagnosics: fast colorimetric method for single nucleotide polymorphism/mutation detection. *Iet Nanobiotechnology*. 1(4). p. 53-57.

DURAND-JOLY, I., CHABÉ, M., SOULA, F., DELHAES, L., CAMUS, D. & DEICAS, E. (2005) Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *FEMS immunology and medical microbiology*. 45 (3). p. 405-10.

DURAND-JOLY, I., RECOURT, C., GUYOT, K., FRANÇOIS, N., WAUQUIER, M., CAMUS, D., & DEI-CAS, E. (2002). *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis is not infectious for SCID mice. *Journal of clinical microbiology*. 40(5). p. 1862-1865.

EDMAN, J. C., KOVACS, J. A., MASUR, H., SANTI, D. V., ELWOOD, H. J., & SOGIN, M. L. (1988). Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*. 334(6182). p. 519.

ELGUEZABAL, N., LOPITZ-OTSOA, F., LAÍN, A., DE LARRINOA, I. F., MORAGUES, M. D., & PONTON, J. (2005). Serodiagnosis of mycoses using recombinant antigens. *Mycopathologia*. 160(2). p. 97-109.

ERIKSSON, O. E., & WINKA, K. (1997). Supraordinal taxa of Ascomycota. *Myconet*. 1(1). p. 1-16.

ESTEVES, F., CALÉ, S. S., BADURA, R., DE BOER, M. G., MALTEZ, F., CALDERON, E. J., VAN DER REIJDEN, T. J., MÁRQUEZ-MARTÍN, E., ANTUNES, F., & MATOS, O. (2015). Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers. *Clinical Microbiology and Infection*. 21(4). 379-e1.

ESTEVES, F., GASPAR, J., DE SOUSA, B., ANTUNES, F., MANSINHO, K., MATOS, O. (2012) *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping in pooled DNA samples: a new approach for clinical and epidemiological studies. *Clinical Microbiology and Infection*. 18. p. E177-E184.

ESTEVES, F., LEE, C.H., de SOUSA, B. BADURA, R., SERINGA, M., FERNANDES, C., GASPAR, J.F., ANTUNES, F. & MATOS, O. (2014) (1-3)-beta-D-glucan in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of *Pneumocystis* pneumonia (PcP) in HIV-infected patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 33 (7). p. 1173-1180.

ESTEVES, F., TAVARES, A., COSTA, M. C., GASPAR, J., ANTUNES, F., & MATOS, O. (2009). Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of

*Pneumocystis jirovecii*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 28(2). p. 175-178.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC), WHO REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. (2018). HIV/AIDS surveillance in Europe 2018 – 2017 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe

EZEKOWITZ, R. A. B., WILLIAMS, D. J., KOZIEL, H., ARMSTRONG, M. Y. K., WARNER, A., RICHARDS, F. F., & ROSE, R. M. (1991). Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*. 351(6322). 155.

FENELON, L. E., KEANE, C. T., BAKIR, M., & TEMPERLEY, I. J. (1985). A cluster of *Pneumocystis carinii* infections in children. *British medical journal (Clinical research ed.)*. 291(6510). 1683.

FINKELMAN, M. A. (2010). *Pneumocystis jirovecii* infection: Cell wall (1→3)-β-D-glucan biology and diagnostic utility. *Critical reviews in microbiology*. 36(4). p. 271-281.

FISHMAN, J.A. (2002) *Pneumocystis carinii* and parasitic infection in the immunocompromised host. In: Clinical approach to infection in the compromised host p(275-334). Boston: Springer.

FLETCHER, L. D., MCDOWELL, J. M., TIDWELL, R. R., MEAGHER, R. B., & DYKSTRA, C. C. (1994). Structure, expression and phylogenetic analysis of the gene encoding actin I in *Pneumocystis carinii*. *Genetics*. 137(3). p. 743-750.

FLEURY, J., ESCUDIER, E., POCHOLLE, M. J., CARRE, C., & BERNAUDIN, J. F. (1985). Cell population obtained by bronchoalveolar lavage in *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Acta cytological*. 29(5). p. 721-726.

FOX, D., & SMULIAN, A. G. (2001). Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Medical mycology*. 39(6). p. 495-507.

FRANCO, R. & PEREIRA, E. (2013). Gold Nanoparticles and Proteins, Interaction. In: Kretsinger, R. H., Uversky, V. N., & Permyakov, E. A. (eds.). Encyclopedia of metalloproteins. p(908-915). New York, NY: Springer New York.

FRÉALLE, E., VALADE, S., GUIGUE, N., HAMANE, S., CHABÉ, M., LE GAL, S., DAMIANI, C., TOTET, A., ALIOUAT, E. M., NEVEZ, G., & MENOTTI, J. (2017). Diffusion of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* colonization: frequency and putative risk factors. *Medical mycology*. 55(5). p. 568-572.

FRENKEL, J. K. (1999). *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 46(5). p. 89S-92S.

FRENS, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature physical science*. 241(105). p. 20.

GAJDUSEK, D. C. (1957). *Pneumocystis carinii*—etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Pediatrics*. 19(4). p. 543-565.

GIANELLA, S., HAEBERLI, L., JOOS, B., LEDERGERBER, B., WÜTHRICH, R. P., WEBER, R., KUSTER, H., HAUSER, P. M., FEHR, T. & MUELLER, N. J. (2010). Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. *Transplant infectious disease*. 12(1). p. 1-10.

GIGLIOTTI F, LIMPER AH, WRIGHT T (2014) *Pneumocystis*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4:a019828.

GIGLIOTTI, F., & WRIGHT, T. W. (2005). Immunopathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Expert reviews in molecular medicine*. 7(26). p. 1-16.

GIGLIOTTI, F., HARMSSEN, A. G., HAIDARIS, C. G., & HAIDARIS, P. J. (1993). *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infection and immunity*. 61(7). p. 2886-2890.

GINGO, M.R., LUCHT, L., DALY, K.R., DJAWE, K., PALELLA, F.J., ABRAHAM, A.G., BREAM, J.H., WITT, M.D., KINGSLEY, L.A., NORRIS, K.A., WALZER, P.D. & MORRIS, A. (2011) Serologic responses to *Pneumocystis* proteins in human immunodeficiency virus patients with and without *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 57 (3). p. 190-196.

GLYNOU, K., IOANNOU, P. C., CHRISTOPOULOS, T. K., & SYRIOPOULOU, V. (2003). Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization. *Analytical Chemistry*. 75(16). p. 4155-4160.

GLOBAL ACTION FUND FOR FUNGAL INFECTIONS (GAFFI). Priority Fungal Infections. [Online]. Disponível em: <http://www.gaffi.org/media/fact-sheets/>. [Acedido em 13 Junho 2019].

GOESCH, T. R., GÖTZ, G., STELLBRINCK, K. H., ALBRECHT, H., WEH, H. J., & HOSSFELD, D. K. (1990). Possible transfer of *Pneumocystis carinii* between immunodeficient patients. *The Lancet*. 336(8715). 627.

GOLDMAN, A. S., GOLDMAN, L. R., & GOLDMAN, D. A. (2005). What caused the epidemic of *Pneumocystis* pneumonia in European premature infants in the mid-20th century? *Pediatrics-English Edition*. 115(6). e725.

GOMES, I. FEIO, M. J., SANTOS, N. C., EATON, P., SERRO, A. P., SARAMAGO, B., PEREIRA, E., & FRANCO, R. (2012) Controlled adsorption of cytochrome c to nanostructured gold surfaces. *Journal of Nanoparticle Research*. 14. p. 1–12.

GREEN, M. (2005). Organometallic based strategies for metal nanocrystal synthesis. *Chemical communications*. (24). p. 3002-3011.

GUIRGIS, B., SÁ E CUNHA, C., GOMES, I., CAVADAS, M., SILVA, I., DORIA, G., BLATCH, G.L., BAPTISTA, P.V., PEREIRA, E., AZZAZY, H.M., MOTA, M.M., PRUDÊNCIO, M. & FRANCO, R. (2012). Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402(3). p. 1019-1027.

HAMADA, H., KOHNO, N., YOKOYAMA, A., HIRASAWA, Y., HIWADA, K., SAKATANI, M. & UEDA, E. (1998) KL-6 as a serologic indicator of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised hosts. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*. 37(3). p. 307-310.

HANAUER, M.; PIERRAT, S.; ZINS, I.; LOTZ, A. & SONNICHSEN, C. (2007) Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size-and shape. *Nano Letters*. 7, p. 2881 – 2885.

HARMSSEN, A. G., & STANKIEWICZ, M. (1990). Requirement for CD4+ cells in resistance to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 172(3). p. 937-945.

HASLETON, P.S., CURRY, A. & RANKIN, E.M. (1981) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a light microscopical and ultrastructural study. *Journal of clinical pathology*. 34 (10). p. 1138-1146.

HAUSER, P. M. (2019). Is the unique camouflage strategy of *Pneumocystis* associated with its particular niche within host lungs? *PLoS pathogens*. 15(1). e1007480.

HAUSER, P. M., BURDET, F. X., Cissé, O. H., KELLER, L., Taffé, P., SANGlard, D., & PAGNI, M. (2010). Comparative genomics suggests that the fungal pathogen *Pneumocystis* is an obligate parasite scavenging amino acids from its host's lungs. *PLoS One*. 5(12). e15152.

HAUSER, P. M., & CUSHION, M. T. (2018). Is sex necessary for the proliferation and transmission of *Pneumocystis*?. *PLoS pathogens*. 14(12). e1007409.

HAYES, D. J., STUBBERFIELD, C. R., MCBRIDE, J. D., & WILSON, D. L. (1991). Alterations in cysteine proteinase content of rat lung associated with development of *Pneumocystis carinii* infection. *Infection and immunity*. 59(10). p. 3581-3588.

HELD, J., KOCH, M.S., REISCHL, U., DANNER, T. & SERR, A. (2011) Serum (1-3)- $\beta$ -D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii*

pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clinical microbiology and infection*. 17 (4). p. 595-602.

HENSHAW, N. G., CARSON, J. L., & COLLIER, A. M. (1985). Ultrastructural observations of *Pneumocystis carinii* attachment to rat lung. *The Journal of infectious diseases*. 151(1). p. 181-186.

HERMANSON, G.T. (2008). *Preparation of colloidal gold-labeled proteins*. In: Bioconjugate techniques, 2<sup>nd</sup> edition, p(924-93). Rockford, Illinois, USA: Elsevier.

HIBBETT, D.S., BINDER, M., BISCHOFF, J.F., BLACKWELL, M., CANNON, P.F., ERIKSSON, O.E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P.M., LUCKING, R., THORSTEN, LUMBSCH, H., LUTZONI, F., MATHENY, P.B., MCLAUGHLIN, D.J., POWELL, M.J., REDHEAD, S., SCHOCH, C.L., SPATAFORA, J.W., STALPERS, J.A., VILGALYS, R., AIME, M.C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G.L., CASTLEBURY, L.A., CROUS, P.W., DAI, Y.C., GAMS, W., GEISER, D.M., GRIFFITH, G.W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D.L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R.A., HYDE, K.D., IRONSIDE, J.E., KOLJALG, U., KURTZMAN, C.P., LARSSON, K.H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J.M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*. 111. p. 509–547.

HIDALGO, H. A., HELMKE, R. J., GERMAN, V. F., & MANGOS, J. A. (1992). *Pneumocystis carinii* induces an oxidative burst in alveolar macrophages. *Infection and immunity*. 60(1). p. 1-7.

HOF, H. (2012). *Pneumocystis jirovecii*: a peculiar fungus posing particular problems for therapy and prophylaxis. *Mycoses*. 55. p. 1-7.

HUANG, L. (2005) Clinical Presentation and Diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia in HIV-Infected Patients. In: Walzer PD, Cushion MT (eds) *Pneumocystis* Pneumonia, 3rd edn, p(349-406). New York: Marcel Dekker

HUANG, L., BEARD, C. B., CREASMAN, J., LEVY, D., DUCHIN, J. S., LEE, S., PIENIAZEK, N., CARTER, J. L., DEL RIO, C., RIMLAND, D., & NAVIN, T. R. (2000). Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *The Journal of infectious diseases*. 182(4). p. 1192-1198.

HUANG, L., CATTAMANCHI, A., DAVIS, J. L., BOON, S. D., KOVACS, J., MESHNICK, S., MILLER, R. F., WALZER, P. D., WORODRIA, W., & MASUR, H. (2011). HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 8(3). p. 294-300.

HUGGETT, J.F., TAYLOR, M.S., KOCJAN, G., EVANS, H.E., MORRIS-JONES, S., GANT, V., NOVAK, T., COSTELLO, A.M., ZUMLA, A. & MILLER, R.F. (2008) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*. 63 (2). p. 154-159.

HUGHES, W. T. (2005) *Pneumocystis* pneumonitis in non-HIV-infected patients: update. In: Walzer PD, Cushion MT (eds) *Pneumocystis* Pneumonia, 3rd edn, p(407-434). New York: Marcel Dekker.

HUGLE, B., SOLOMON, M., HARVEY, E., JAMES, A., WADHWA, A., AMIN, R., BELL-PETER, A., & BENSELER, S. (2010). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia following rituximab treatment in Wegener's granulomatosis. *Arthritis care & research*. 62(11). p. 1661-1664.

JAIN, K. K. (2003). Nanodiagnosics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*. 3(2). p. 153-161.

JAIN, P. K., HUANG, X., EL-SAYED, I. H., EL-SAYED, M. A. (2008) Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Accounts of chemical research*. 41(12). p. 1578–86.



JANWAN, P., INTAPAN, P.M., YAMASAKI, H., RODPAI, R., LAUMMAUNWAI, P., THANCHOMNANG, T., SANPOOL, O., KOBAYASHI, K., TAKAYAMA, K., KOBAYASHI, Y., TAKAYAMA, K., KOBAYASHI, Y., & MALEEWONG, W. (2016) Development and usefulness of an immunochromatographic device to detect antibodies for rapid diagnosis of human gnathostomiasis. *Parasites & Vectors*. 9. p. 14.

JENSEN, B. N., LISSE, I. M., GERSTOFT, J., BORGESKOV, S., & SKINHØJ, P. (1991). Cellular profiles in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients with pulmonary symptoms: relation to diagnosis and prognosis. *AIDS (London, England)*. 5(5). p. 527-533.

KANESHIRO, E. S., CUSHION, M., WALZER, P. D., & JAYASIMHULU, K. (1989). Analyses of *Pneumocystis* fatty acids. *The Journal of protozoology*. 36. p. 69s-72s.

KEELY SP, RENAULD H, WAKEFIELD AE, CUSHION MT, SMULIAN AG, FOSKER N, FRASER A, HARRIS D, MURPHY L, PRICE C, QUAIL MA, SEEGER K, SHARP S, TINDAL CJ, WARREN T, ZUIDERWIJK E, BARRELL BG, STRINGER JR, & HALL N (2005) Gene arrays at *Pneumocystis carinii* telomeres. *Genetics*. 170. p. 1589–600.

KEELY, S. P., BAUGHMAN, R. P., SMULIAN, A. G., DOHN, M. N., & STRINGER, J. R. (1996). Source of *Pneumocystis carinii* in recurrent episodes of pneumonia in AIDS patients. *AIDS (London, England)*. 10(8). p. 881-888.

KEELY, S. P., FISCHER, J. M., CUSHION, M. T., & STRINGER, J. R. (2004). Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology*. 150(5). p. 1153-1165.

KEELY, S.P, & STRINGER, J.R. (2009) Complexity of the MSG gene family of *Pneumocystis carinii*. *BMC Genomics*. 10. p. 367.

KEELY, S. P., STRINGER, J. R., BAUGHMAN, R. P., LINKE, M. J., WALZER, P. D., & SMULIAN, A. G. (1995). Genetic variation among *Pneumocystis carinii*

hominis isolates in recurrent pneumocystosis. *Journal of Infectious Diseases*. 172(2). p. 595-598.

KELLY, M. N. & SHELLITO, J.E. (2010) Current understanding of *Pneumocystis* immunology. *Future microbiology*. 5 (1). p. 43-65.

KHAN, I.H., SAYEED, M.A., SULTANA, N., ISLAM, K., AMIN, J., FARUK, M.O., KHAN, U., KHANAM, F., RYAN, E.T., & QADRI, F. (2016) Development of a simple, peripheral-blood-based lateral-flow dipstick assay for accurate detection of patients with enteric fever. *Clinical and Vaccine Immunology*. 23. p. 403–409.

KIM, S. J., LEE, J., CHO, Y. J., PARK, Y. S., LEE, C. H., YOON, H. I., LEE, S. M., YIM, J. J., LEE, J. H., YOO, C. G., LEE, C. T., KIM, Y., W., HAN, S. K., KIM, H. B. & PARK, J. S. (2014). Prognostic factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients without HIV infection. *Journal of infection*. 69(1). p. 88-95.

KIM, S., WARK, A. W., & LEE, H. J. (2016). Gel electrophoretic analysis of differently shaped interacting and non-interacting bioconjugated nanoparticles. *RSC Advances*. 6(111). p. 109613-109619.

KIMLING, J., MAIER, M., OKENVE, B., KOTAIDIS, V., BALLOT, H., & PLECH, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*. 110(32). p. 15700-15707.

KLING, H. M., & NORRIS, K. A. (2016). Vaccine-induced immunogenicity and protection against *Pneumocystis* pneumonia in a nonhuman primate model of HIV and *Pneumocystis* coinfection. *The Journal of infectious diseases*. 213(10). p. 1586-1595.

KOCZULA, K. M., & GALLOTTA, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*. 60(1). p. 111-120.

KOVACS, J. A., HIEMENZ, J. W., MACHER, A. M., STOVER, D., MURRAY, H. W., SHELHAMER, J., LANE, H. C., URMACHER, C., HONIG, C., LONGO, D.L., & PARKER, M. M. (1984). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between

patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. *Annals of internal medicine*. 100(5). p. 663-671.

KOVACS, J. A., NG, V. L., NG, V. L., LEOUNG, G., HADLEY, W. K., EVANS, G., LANE, H.C., OGNIBENE, F.P., SHELFHAMER, J., PARRILLO, J.E., & GILL, V. J. (1988). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *New England Journal of Medicine*. 318(10). p. 589-593.

KUCERA, K. (1967). Pneumocystosis as an anthroponosis. *Annales de parasitologie humaine et compare*. 42(5). p. 465-481.

KUROKAWA, T., KAYA, H., & YOSHIDA, T. (2010). Two cases of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia with non-Hodgkin's lymphoma after CHOP-based chemotherapy containing rituximab. *Journal of clinical and experimental hematopathology*. 50(2). p. 159-162.

KUTTY, G., & KOVACS, J. A. (2003). A single-copy gene encodes Kex1, a serine endoprotease of *Pneumocystis jiroveci*. *Infection and immunity*. 71(1). p. 571-574.

KUTTY, G., HERNANDEZ-NOVOA, B., CZAPIGA, M., & KOVACS, J.A. (2008) *Pneumocystis* encodes a functional S-adenosylmethionine synthetase gene. *Eukaryot Cell*. 7. p. 258-267.

LAROCQUE, R. C., KATZ, J. T., PERRUZZI, P., & BADEN, L. R. (2003). The utility of sputum induction for diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised patients without human immunodeficiency virus. *Clinical infectious diseases*. 37(10). p. 1380-1383.

LATOUCHE, S., OLSSON, M., POLACK, B., BRUN-PASCAUD, M. O. N. I. Q. U. E., BERNARD, C., & ROUX, P. (1997). Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. in Air Samples Collected in Animal Rooms. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 44. p. 46s-47s.

LAURSEN, A. L., MØLLER, B., RUNGBY, J., PETERSEN, C. M., & ANDERSEN, P. L. (1994). *Pneumocystis carinii*-induced activation of the respiratory burst in

human monocytes and macrophages. *Clinical & Experimental Immunology*. 98(2). p. 196-202.

LAUTENSCHLAGER, I., LYYTIKAINEN, O., JOKIPII, L., JOKIPII, A., MAICHE, A., RUUTU, T., TUKIAINEN, P., RUUTU, P. (1996) Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *Journal of Clinical Microbiology*. 34. p. 728-730.

LEE, L. H., GIGLIOTTI, F., WRIGHT, T. W., SIMPSON-HAIDARIS, P. J., WEINBERG, G. A., HAIDARIS, C. G. (2000) Molecular characterization of KEX1, a kexin-like protease in mouse *Pneumocystis carinii*. *Gene* 242. p. 141-150.

LIM, J., LEE, N., LEE, E. & YOON, S. (2014) Surface modification of citrate-capped gold nanoparticles using CTAB micelles. *Bull Korean Chemistry Society* 35. p. 2567-2569.

LIMPER, A. H., OFFORD, K. P., SMITH, T. F., & MARTIN, W. J. (1989) *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *American Review of Respiratory Disease*. 140. p. 1204-1209.

LIMPER, A. H., & MARTIN, W. J. (1990). *Pneumocystis carinii*: inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment. *The Journal of clinical investigation*. 85(2). p. 391-396.

LIMPER, A. H., EDENS, M., ANDERS, R. A., & LEOF, E. B. (1998). *Pneumocystis carinii* inhibits cyclin-dependent kinase activity in lung epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 101(5). p. 1148-1155.

LIMPER, A. H., HOYTE, J. S., & STANDING, J. E. (1997). The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung. *The Journal of clinical investigation*. 99(9). p. 2110-2117.

LIMPER, A. H., STANDING, J. E., HOFFMAN, O. A., CASTRO, M. A. R. I. O., & NEESE, L. W. (1993). Vitronectin binds to *Pneumocystis carinii* and mediates

organism attachment to cultured lung epithelial cells. *Infection and immunity*. 61(10). p. 4302-4309.

LIPSCHIK, G. Y., ANDRAWIS, V. A., OGNIBENE, F. P., KOVACS, J. A., GILL, V. J., NELSON, N. A., LUNDGREN, M. D., & NIELSEN, J. O. (1992). Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. *The Lancet*. 340(8813). p. 203-206.

LIU, G. L., RODRIGUEZ, V. B., & LEE, L. P. (2005). Time-resolved optical sensing of oligonucleotide hybridization via Au colloidal nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 5(11). p. 1933-1937.

LIU, X., DAI, Q., AUSTIN, L., COUTTS, J., KNOWLES, G., ZOU, J., Chen, H., & HUO, Q. (2008). A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. *Journal of the American Chemical Society*. 130(9). p. 2780-2782.

LIU, Y., FAHLE, G. A., & KOVACS, J. A. (2018). Inability to Culture *Pneumocystis jirovecii*. *MBio*. 9(3). e00939-18.

LIZ-MARZÁN, L. M. (2006). Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir*. 22(1). p. 32-41.

LOPEZ-LORENTE, A.I., SIMONET, B.M., & VALCARCEL, M. (2011) Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 30. p. 58-71.

LOWE, D. M., RANGAKA, M. X., GORDON, F., JAMES, C. D., & MILLER, R. F. (2013). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in tropical and low and middle income countries: a systematic review and meta-regression. *PloS one*, 8(8), e69969.

LUND, F. E., HOLLIFIELD, M., SCHUER, K., LINES, J. L., RANDALL, T. D., & GARVY, B. A. (2006). B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. *The Journal of Immunology*. 176(10). p. 6147-6154.

LUND, F. E., SCHUER, K., HOLLIFIELD, M., RANDALL, T. D., & GARVY, B. A. (2003). Clearance of *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on B cells but not on *P. carinii*-specific antibody. *The Journal of Immunology*. 171(3). p. 1423-1430.

LUNDBERG, B. E., DAVIDSON, A. J. & BURMAN, W. J. (2000). Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in an era of effective prophylaxis: the relative contribution of non-adherence and drug failure. *AIDS*. 14. p. 2559-2566.

MA, L., BORIO, L., MASUR, H., & KOVACS, J. A. (1999). *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *Journal of Infectious Diseases*. 180(6). p. 1969-1978.

MA, L., CHEN, Z., HUANG, D. W., KUTTY, G., ISHIHARA, M., WANG, H., ABOUELLEIL, A., BISHOP, L., DAVEY, E., DENG, R., DENG, X., FAN, L., FANTONI, G., FITZGERALD, M., GOGINENI, E., GOLDBERG, J. M., HANDLEY, G., HU, X., HUBER, C., JIAO, X., JONES, K., LEVIN, J. Z., LIU, Y., MACDONALD, P., MELNIKOV, A., RALEY, C., SASSI, M., SHERMAN, B.T., SONG, X., SYKES, S., TRAN, B., WALSH, L., XIA, Y., YANG, J., YOUNG, S., ZENG, Q., ZHENG, X., STEPHENS, R., NUSBAUM, C., BIRREN, B.W., AZADI, P., LEMPICKI, R. A., CUOMO, C.A., & KOVACS, J.A. (2016). Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nature communications*. 7. 10740.

MA, L., CISSÉ, O. H., & KOVACS, J. A. (2018). A Molecular Window into the Biology and Epidemiology of *Pneumocystis* spp. *Clinical microbiology reviews*. 31(3). e00009-18.

MA, L., HUANG, D.W., CUOMO, C.A., SYKES, S., FANTONI, G., DAS, B., SHERMAN, B.T., YANG, J., HUBER, C., XIA, Y., DAVEY, E., KUTTY, G., BISHOP, L., SASSI, M., LEMPICKI, R.A., KOVACS, J.A. (2013). Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. *The FASEB Journal*. 27(5). p. 1962-1972.

MAERTENS, J., CESARO, S., MASCHMEYER, G., EINSELE, H., DONNELLY, J. P., ALANIO, A., HAUSER, P.M., LAGROU, K., MELCHERS, W.J., HELWEG-LARSEN, J., MATOS, O., BRETAGNE, S. & CORDONNIER, C. (2016). 5th European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-5), a joint venture of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the Immunocompromised Host Society (ICHS) and the European LeukemiaNet (ELN). ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71(9). p. 2397-2404.

MAGAMBO, K. A., KALLUVYA, S. E., KAPOOR, S. W., SENI, J., CHOFLE, A. A., FITZGERALD, D. W., & DOWNS, J. A. (2014). Utility of urine and serum lateral flow assays to determine the prevalence and predictors of cryptococcal antigenemia in HIV-positive outpatients beginning antiretroviral therapy in Mwanza, Tanzania. *Journal of the International AIDS Society*. 17(1). p. 19040.

MAINI, R., HENDERSON, K.L., SHERIDAN, E.A., LAMAGNI, T., NICHOLS, G., DELPECH, V., PHIN, N. (2013) Increasing *Pneumocystis* pneumonia, England, UK, 2000–2010. *Emerging infectious diseases*. 19. p. 386–392.

MALIN, A. S., GWANZURA, L. K., KLEIN, S., ROBERTSON, V. J., MUSVAIRE, P. & MASON, P. R. (1995). *Pneumocystis carinii* pneumonia in Zimbabwe. *Lancet*. 346. p. 1258-1261.

MANSHARAMANI, N. G., BALACHANDRAN, D., VERNOVSKY, I., GARLAND, R., & KOZIEL, H. (2000). Peripheral blood CD4+ T-lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Chest*. 118(3). p. 712-720.

MARCOTTE, H., LEVESQUE, D., DELANAY, K., BOURGEAULT, A., DE LA DURANTAYE, R., BROCHU, S., & LAVOIE, M. C. (1996). *Pneumocystis carinii* infection in transgenic B cell-deficient mice. *Journal of Infectious Diseases*. 173(4). p. 1034-1037.

MASSON, J. F. (2017). Surface plasmon resonance clinical biosensors for medical diagnostics. *ACS sensors*. 2(1). p. 16-30.

MASUR, H. (1992) Prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 327(26). p. 1853-1860.

MATOS, O., & ESTEVES, F. (2010) Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite*. 17(3). p. 219-232.

MATOS, O., & ESTEVES, F. (2016) Laboratory diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. In: Microbiology of respiratory system infection, p(185-210). United Kingdom: Elsevier.

MATOS, O., LUNDGREN, B., CALDEIRA, L., MANSINHO, K., AGUIAR, P., FORTE, M., & ANTUNES, F. (1999). Evaluation of a nested PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in serum from immunocompromised patients. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 46(5). p. 104S-105S.

MATOS, O., TOMÁS, A. L., & ANTUNES, F. (2017). *Pneumocystis jirovecii* and PcP. In: Montes, H. M. M. & Lopes-Bezerra, L. M. (eds) Current Progress in Medical Mycology, p(215-254). Switzerland: Springer International Publishing

MATSUMURA, Y., ITO, Y., IINUMA, Y., YASUMA, K., YAMAMOTO, M., MATSUSHIMA, A., NAGAO, M., TAKAMURA, S., ICHIYAMA, S. (2012) Quantitative real-time PCR and the (1→3)-β-Dglucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clinical Microbiology and Infection*. 18. p. 591-597.

MEDRANO, F. J., MONTES-CANO, M., CONDE, M., DE LA HORRA, C., RESPALDIZA, N., GASCH, A., CALDERON, E. J. (2005). *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerging infectious diseases*. 11(2). p. 245.

MEI, Q., TURNER, R. E., SORIAL, V., KLIVINGTON, D., ANGUS, C. W., & KOVACS, J. A. (1998). Characterization of major surface glycoprotein genes of



human *Pneumocystis carinii* and high-level expression of a conserved region. *Infection and immunity*. 66(9). p. 4268-4273.

MENOTTI, J., EMMANUEL, A., BOUCHEKOUK, C., CHABE, M., CHOUKRI, F., POTTIER, M., SARFATI, C., ALIOUAT, E. M. & DEROUIN, F. (2013). Evidence of airborne excretion of *Pneumocystis carinii* during infection in immunocompetent rats. Lung involvement and antibody response. *PloS one*. 8(4). e62155.

MILLEDGE, J., KAKAKIOS, A., GILLIS, J. & FITZGERALD, DA (2003) *Pneumocystis carinii* pneumonia as a presenting feature of X-linked hyper-IgM syndrome. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 39. p. 704-706.

MILLEDGE, J., KAKAKIOS, A., GILLIS, J., & FITZGERALD, D. A. (2003). *Pneumocystis carinii* pneumonia as a presenting feature of X-linked hyper-IgM syndrome. *Journal of paediatrics and child health*. 39(9). p. 704-706.

MILLER, R.F., HUANG, L. & WALZER, P.D. (2013) *Pneumocystis* pneumonia associated with human immunodeficiency virus. *Clinics in chest medicine*. 34 (2). p. 229-241.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Direção-Geral da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Doutor

Ricardo Jorge. Infecção VIH e SIDA em Portugal - 2019. Lisboa: DGS/INSA; 2019.

MODY, V. V, SIWALE, R., SINGH, A. & MODY, H. R. (2010) Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2(4). p. 282–9

MOE, A. A. & HARDY, W. D. (1994). *Pneumocystis carinii* infection in the HIV-seropositive patient. *Infectious disease clinics of North America*. 8. p. 331-364.

MOIR, S., & FAUCI, A.S. (2009) B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology*. 9. p.235–45.

MONNET, X.; VIDAL-PETIOT, E.; OSMAN, D.; HAMZAOU, O.; DURRBACH, A.; GOUJARD, C.; MICELI, C.; BOURÉE, P.; & RICHARD, C. (2008) Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis* pneumonia in patients with and without HIV infection. *Critical Care*. 12. R28

MORENO AMADOR, M. D. L., CEBOLLA, Á., MUÑOZ SUANO, A., CARRILLO CARRIÓN, C., COMINO MONTILLA, I. M., PIZARRO, Á., & SOUSA MARTÍN, C. (2017). Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*. 66 (2). p. 250-257.

MORI, S., & SUGIMOTO, S. (2012) *Pneumocystis jirovecii* infection: an emerging threat to patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 51. p. 2120-2130.

MORRIS, A., & NORRIS, K. A. (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clinical microbiology reviews*. 25(2). p. 297-317.

MORRIS, A., LUNDGREN, J.D., MASUR, K., WALZER, P.D., HANSON, D.L., FREDERICK, T., HUANG, L., BEARD, C.B. & KAPLAN, J.E. (2004) Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerging infectious diseases*. 10 (10). p. 1713-1720.

MORRIS, A., SCIURBA, F.C., & NORRIS, K.A. (2008) *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD*. 5. p. 43–51a.

MORRIS, A. M. & MASUR, H. (2011) A serologic test to diagnose *Pneumocystis* pneumonia: are we there yet? *Clinical Infectious Disease*. 53 (2). p. 203–204.

MULPURU, S., KNOLL, G., WEIR, C., DESJARDINS, M., JOHNSON, D., GORN, I., FAIRHEAD, T., BISSONNETTE, J., BRUCE, N., TOYE, B., SUH, K., & ROTH, V. (2016). *Pneumocystis* pneumonia outbreak among renal transplant recipients at a North American transplant center: Risk factors and implications for infection control. *American journal of infection control*. 44(4). p. 425-431.

MURPHY, C. J., SAU, T. K., GOLE, A. M., ORENDORFF, C. J., GAO, J., GOU, L., HUNYADI, S. E. & LI, T. (2005). Anisotropic metal nanoparticles: synthesis,

assembly, and optical applications. *The journal of physical chemistry. B.* 109(29). p. 13857-13871

NAKAMURA, H., TATEYAMA, M., TASATO, D., HARANAGA, S., YARA, S., HIGA, F., OHTSUKI, Y., & FUJITA, J. (2009). Clinical Utility of Serum  $\beta$ -D-Glucan and KL-6 Levels in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Internal Medicine.* 48(4). p. 195-202.

NAKANO, S., TSUKIMURA, T., TOGAWA, T., OHASHI, T., KOBAYASHI, M., TAKAYAMA, K., KOBAYASHI, Y., ABIKO, H., SATOU, M., NAKAHATA, T., WARNOCK, D. G., SAKURABA, H., & SHIBASAKI, F (2015) Rapid immunochromatographic detection of serum anti-galactosidase A antibodies in fabry patients after enzyme replacement therapy. *PLoS ONE.* 10. e0128351.

NAM, J. M., THAXTON, C. S., & MIRKIN, C. A. (2003). Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science.* 301(5641). p. 1884-1886.

NEUMANN, S., KRAUSE, S. W., MASCHMEYER, G., SCHIEL, X., & VON LILIENFELD-TOAL, M. (2013). Primary prophylaxis of bacterial infections and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with hematological malignancies and solid tumors. *Annals of hematology.* 92(4). p. 433-442.

NEVEZ, G., JOUNIEAUX, V., LINAS, M. D., GUYOT, K., LEOPHONTE, P., MASSIP, P., SCHMTT, J. L., SEQUELA, J. P., CAMUS, D., DEI-CAS, E., RACCURT, C. & MAZARS, E (1997). High Frequency of *Pneumocystis carinii* sp. f. hominis Colonization in HIV-Negative Patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 44. p. 36s-36s.

NG, V. L., YAJKO, D. M., & HADLEY, W. K. (1997). Extrapulmonary pneumocystosis. *Clinical microbiology reviews.* 10(3). p. 401-418.

NISHIDA, H., & SUGIYAMA, J. (1994). Archiascomycetes: detection of a major new lineage within the Ascomycota. *Mycoscience.* 35(4). p. 361-366.

NORDE, W. (1986) Adsorption of proteins from solution at the solid–liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*. 25. p. 267-340.

NÜESCH, R., BELLINI, C., & ZIMMERLI, W. (1999). *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Human Immunodeficiency Virus (HIV)—Positive and HIV-Negative Immunocompromised Patients. *Clinical infectious diseases*. 29(6). p. 1519-1523.

O’FARRELL, B. (2013). Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays In: Wild, D. (ed.) *The Immunoassay Handbook*, fourth edition. p(89-108). Oxford, UK: Elsevier Ltd.

OLADELE, R. O., OTU, A. A., RICHARDSON, M. D., & DENNING, D. W. (2018). Diagnosis and Management of *Pneumocystis* Pneumonia in Resource-poor Settings. *Journal of health care for the poor and underserved*. 29(1). p. 107-158.

OLSSON, M., STRÅLIN, K. & HOLMBERG, H (2001) Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection*. 7. p. 492-497.

OLSSON, M., SUKURA, A., LINDBERG, L. A., & LINDER, E. (1996). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 28(3). p. 279-282.

OVERGAARD, U. M., & HELWEG-LARSEN, J. (2007). *Pneumocystis jiroveci* pneumonia (PCP) in HIV-1-negative patients: a retrospective study 2002–2004. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 39(6-7). p. 589-595.

PANEL ON OPPORTUNISTIC INFECTIONS IN ADULTS AND ADOLESCENTS WITH HIV (2019). Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in adults and adolescents with HIV: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Available at [http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult\\_oi.pdf](http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf). [acedido a 22 Julho 2019].

PAREJA, J. G., GARLAND, R., & KOZIEL, H. (1998). Use of adjunctive corticosteroids in severe adult non-HIV *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest*. 113(5). p. 1215-1224.

PEGLOW, S. L., SMULIAN, A. G., LINKE, M. J., POGUE, C. L., NURRE, S., CRISLER, J., PHAIR, J., GOLD, J. W., ARMSTRONG, D., & WALZER, P. D. (1990). Serologic responses to *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease. *Journal of Infectious Diseases*. 161(2). p. 296-306.

PHAIR, J., MUÑOZ, A., DETELS, R., KASLOW, R., RINALDO, C., SAAH, A., & MULTICENTER AIDS COHORT STUDY GROUP. (1990). The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine*. 322(3). p. 161-165.

PHILIPPE, L., RENE, C., GUILLOT, J., BERTHALEMY, M., POLACK, B., LAINE, V., LACUBE, P., CHERMETTE, R., & ROUX, P. (1999). Impaction versus filtration for the detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 46(5). p. 94S-94S.

PONCE, C. A., CHABÉ, M., GEORGE, C., CÁRDENAS, A., DURÁN, L., GUERRERO, J., BUSTAMENATE, R., MATOS, O., HUANG, L., MILLER, R. F., & VARGAS, S. L. (2017) High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations in patients with a first episode of *Pneumocystis* pneumonia in Santiago, Chile, and clinical response to trimethoprim-sulfamethoxazole therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 61(2). e01290-16.

POTTRATZ, S. T., & MARTIN, W. J. (1990). Role of fibronectin in *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells. *The Journal of clinical investigation*. 85(2). p. 351-356.

POTTRATZ, S. T., PAULSRUD, J., SMITH, J. S., & MARTIN, W. J. (1991). *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp 120, a fibronectin binding protein. *The Journal of clinical investigation*. 88(2). p. 403-407.

QIAN, Y. (2014). Gold nanomaterials bioconjugates In: Narain, R. (ed.) Chemistry of bioconjugates: synthesis, characterization, and biomedical applications. p(257-280). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

QUESADA-GONZÁLEZ, D. & MERKOÇI, A. (2015). Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 73. p. 47–63.

RABODONIRINA, M., COTTE, L., BOIBIEUX, A., KAISER, K., MAYENÇON, M., RAFFENOT, D., TREPO, C., PEYRAMOND, D., & PICOT, S. (1999). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by nested PCR. *Journal of clinical microbiology.* 37(1). p. 127-131.

RABODONIRINA, M., VANHEMS, P., COURAY-TARGE, S., GILLIBERT, R. P., GANNE, C., NIZARD, N., COLIN, C., FABRY, J., TOURAINE, J. L., MELLE, G. V., NAHIMANA, A., FRANCIOLI, P., & HAUSER, P (2004). Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerging infectious diseases.* 10(10). 1766.

RAVIGLIONE, M. C. (1990). Extrapulmonary pneumocystosis: the first 50 cases. *Reviews of infectious diseases.* 12(6). p. 1127-1138.

REDHEAD, S. A., CUSHION, M. T., FRENKEL, J. K., & STRINGER, J. R. (2006). *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 53(1). p. 2-11.

RIPAMONTI, C., ORENSTEIN, A., KUTTY, G., HUANG, L., SCHUHEGGER, R., SING, A., FANTONI, G., ATZORI, C., VINTON, C., HUBER, C., CONVILLE, P. S., & KOVACS, J. A. (2009). Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among *Pneumocystis jirovecii* isolates. *The Journal of infectious diseases.* 200(10). p. 1616-1622.

RODRIGUEZ, M. & FISHMAN, J.A (2004) Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*. 17. p. 770–782.

ROHNER, P., JACOMO, V., STUDER, R., SCHRENZEL, J., & GRAF, J.D. (2009) Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. *Infection*. 37. p. 261-265.

ROSSITER, S. J., MILLER, C., CHURG, A. M., CARRINGTON, C. B., & MARK, J. B. (1979). Open lung biopsy in the immunosuppressed patient. Is it really beneficial? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 77(3). p. 338-345.

ROTHS, J. B., MARSHALL, J. D., ALLEN, R. D., CARLSON, G. A., & SIDMAN, C. L. (1990). Spontaneous *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunodeficient mutant scid mice. Natural history and pathobiology. *The American journal of pathology*. 136(5). p. 1173.

ROUX, P., LAVRARD, I., POIROT, J. L., CHOUAID, C., DENIS, M., OLIVIER, J. L., NIGOU, M., & MILTGEN, M. (1994). Usefulness of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *Journal of clinical microbiology*, 32(9), 2324-2326.

RUFFOLO, J.J., CUSHION, M.T. & WALZER, P.D. (1989) Ultrastructural observations on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *The Journal of protozoology*. 36 (1). p. 53S-54S.

SABINO, R., VERISSÍMO, C., BRANDÃO, J., MARTINS, C., ALVES, D., PAIS, C., & DENNING, D. W. (2017). Serious fungal infections in Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 36(7). p. 1345-1352.

SADAGHDAR, H., HUANG, Z. B., & EDEN, E. (1992). Correlation of bronchoalveolar lavage findings to severity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS: evidence for the development of high-permeability pulmonary edema. *Chest*. 102(1). p. 63-69.

SAJID, M., KAWDE, A.-N. & DAUD, M. (2014) Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 19(6). p. 689-705.

SASSI, M., RIPAMONTI, C., MUELLER, N. J., YAZAKI, H., KUTTY, G., MA, L., HUBER, C., GOGINENI, E., OKA, S., GOTO, N., FEHR, T., GIANELLA, S., KONRAD, R., SING, A., & KOVACS JA (2012). Outbreaks of *Pneumocystis* pneumonia in 2 renal transplant centers linked to a single strain of *Pneumocystis*: implications for transmission and virulence. *Clinical infectious diseases*. 54(10). p. 1437-1444.

SCHILDGEN, V., MAI, S., KHALFAOUI, S., LÜSEBRINK, J., PIEPER, M., TILLMANN, R. L., & SCHILDGEN, O. (2014). *Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells. *MBio*. 5(3). e01186-14.

SCHLUGER, N., SEPKOWITZ, K., ARMSTRONG, D., BERNARD, E., RIFKIN, M., CERAMI, A., & BUCALA, R. (1991). Detection of *Pneumocystis carinii* in serum of AIDS patients with *Pneumocystis* pneumonia by the polymerase chain reaction. *The Journal of protozoology*. 38(6). p. 240S-242S.

SCHRAMM, E.C., STATEN, N.R., ZHANG, Z., BRUCE, S.S., KELLNER, C., ATKINSON, J.P., KYTTARIS, V. C., TSOKOS, G. C., PETRIE, M., CONNOLLY, S., & OLSON, P.K (2015) A quantitative lateral flow assay to detect complement activation in blood. *Analytical Biochemistry*. 477. p. 78–85.

SELWYN, P. A., PUMERANTZ, A. S., DURANTE, A., ALCABES, P. G., GOUREVITCH, M. N., BOISELLE, P. G., & ELMORE, J. G. (1998). Clinical predictors of *Pneumocystis carinii* pneumonia, bacterial pneumonia and tuberculosis in HIV-infected patients. *Aids*. 12(8). p. 885-893.

SHEEHAN, D. (2013) *Physical Biochemistry: Principles and Applications* p(153-213). Chichester: John Wiley & Sons.



SHELLITO, J. E., TATE, C., RUAN, S., & ROLLS, J. (2000). Murine CD4+ T lymphocyte subsets and host defense against *Pneumocystis carinii*. *Journal of Infectious Diseases*. 181(6). p. 2011-2017.

SHIPLEY, T. W., KLING, H. M., MORRIS, A., PATIL, S., KRISTOFF, J., GUYACH, S. E., MURPHY, J. E., SHAO, X., SCIURBA, F.C., ROGERS, R. M., RICHARDS, T., THOMPSON, P., MONTELARO, R.C., COXSON, H. O., HOGG, J. C., & RICHARDS, T. (2010). Persistent *Pneumocystis* colonization leads to the development of chronic obstructive pulmonary disease in a nonhuman primate model of AIDS. *The Journal of infectious diseases*. 202(2). p. 302-312.

SIMONDS, R. J., HUGHES, W. T., FEINBERG, J., & NAVIN, T. R. (1995). Preventing *Pneumocystis carinii* pneumonia in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clinical infectious diseases*. 21(Supplement\_1). p. S44-S48.

SINCLAIR, K., WAKEFIELD, A. E., BANERJI, S., & HOPKIN, J. M. (1991). *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Molecular and biochemical parasitology*. 45(1). p. 183.

SING, A., ROGGENKAMP, A., AUTENRIETH, I. B., & HEESEMANN, J. (1999). *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *Journal of clinical microbiology*. 37(10). p. 3409-3410.

SINGER, C., ARMSTRONG, D., ROSEN, P. P., & SCHOTTENFELD, D. (1975). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a cluster of eleven cases. *Annals of internal medicine*. 82(6). p. 772-777.

SKALSKI, J. H., KOTTOM, T. J., & LIMPER, A. H. (2015). Pathobiology of *Pneumocystis* pneumonia: life cycle, cell wall and cell signal transduction. *FEMS yeast research*, 15(6).

SKELLY, M., HOFFMAN, J., FABBRI, M., HOLZMAN, R.S., CLARKSON, A.B. JR., & MERALI, S. (2003) Sadenosylmethionine concentrations in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet*. 361. p. 1267-1268.

SKELLY, M.J., HOLZMAN, R.S. & MERALI, S. (2008) S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clinical infectious diseases*. 46 (3). p. 467-471.

SMITH, D. E., WYATT, J., MCLUCKIE, A., & GAZZARD, B. (1988). Severe exercise hypoxaemia with normal or near normal X-rays: a feature of *Pneumocystis carinii* infection. *The Lancet*. 332(8619). p. 1049-1051.

SOARES, L., CSÁKI, A., JATSCHKA, J., FRITZSCHE, W., FLORES, O., FRANCO, R., & PEREIRA, E. (2014). Localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensing using gold nanotriangles: detection of DNA hybridization events at room temperature. *Analyst*. 139(19). p. 4964-4973.

SOTNIKOV, D.V., BYZOVA, N.A., ZHERDEV, A.V., ESKENDIROVA, S.Z., BALTIN, K.K., MUKANOV, K.K., RAMANKULOV, E.M., SADYKHOV, E.G., & DZANTIEV, B.B. (2015a) Express immunochromatographic detection of antibodies against *Brucella Abortus* in cattle sera based on quantitative photometric registration and modulated cut-off level. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 36. p. 80–90.

SOTNIKOV, D.V., ZHERDEV, A.V., AVDIENKO, V.G., & DZANTIEV, B.B. (2015b) Immunochromatographic assay for serodiagnosis of tuberculosis using an antigen-colloidal gold conjugate. *Applied biochemistry and microbiology*. 51. p. 834–839.

SOTNIKOV, V.D., ZHERDEV, V.A. & DZANTIEV, B.B. (2018) Theoretical and Experimental Comparison of Different Formats of Immunochromatographic Serodiagnostics. *Sensors*. 18(1).

SOWDEN, E., & CARMICHAEL, A. J. (2004). Autoimmune inflammatory disorders, systemic corticosteroids and *pneumocystis* pneumonia: a strategy for prevention. *BMC infectious diseases*. 4(1). p. 42.

SPERLING, R. A., & PARAK, W. J. (2010). Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 368(1915). p. 1333-1383.

STEELE, C., MARRERO, L., SWAIN, S., HARMSSEN, A. G., ZHENG, M., BROWN, G. D., GORDON, S., SHELLITO, J. E., & KOLLS, J. K. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the dectin-1  $\beta$ -glucan receptor. *Journal of Experimental medicine*. 198(11). p. 1677-1688.

STORHOFF, J. J., ELGHANIAN, R., MIRKIN, C. A., & LETSINGER, R. L. (2002). Sequence-dependent stability of DNA-modified gold nanoparticles. *Langmuir*. 18(17). p. 6666-6670.

STRINGER, J. R. (2007). Antigenic Variation in *Pneumocystis* 1. *Journal of eukaryotic microbiology*. 54(1). p. 8-13.

STRINGER, J.R. & KEELY, S.P. (2001) Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infection and immunity*. 69 (2). p. 627-639.

STRINGER, J.R. (2005) Surface Antigens. In: Walzer, P. & Cushion, M. (eds.). *Pneumocystis* Pneumonia. Third Edition Volume 194 p(95-126). New York: Marcel Dekker

STRINGER, S. L., STRINGER, J. R., BLASE, M. A., WALZER, P. D., & CUSHION, M. T. (1989). *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Experimental parasitology*. 68(4). p. 450-461.

SUKURA, A., KONTTINEN, Y. T., SEPPER, R., KAARTINEN, L., SORSA, T., & LINDBERG, L. A. (1995). Collagenases and the serine proteinases elastase and

cathepsin G in steroid-induced *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of clinical microbiology*. 33(4). p. 829-834.

TAMBURRINI, E., MENCARINI, P., VISCONTI, E., ZOLFO, M., DE LUCA, A., SIRACUSANO, A., ORTONA, E., & WAKEFIELD, A. E. (1996). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *Journal of clinical microbiology*. 34(6). p. 1586-1588.

TANAKA, R., YUHI, T., NAGATANI, N., ENDO, T., KERMAN, K., TAKAMURA, Y., & TAMIYA, E. (2006). A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 385(8). p. 1414-1420.

TANG, X., BARTLETT, M.S., SMITH, J.W., LU, J.J. & LEE, C.H. (1998) Determination of copy number of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f. sp. *Hominis*. *Journal of clinical microbiology*. 36 (9). p. 2491-2494.

TASAKA S., HASEGAWA N., KOBAYASHI S., YAMADA, W., NISHIMURA, T., TAKEUCHI, T. & ISHIZAKA, A. (2007) Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest*. 131 (4). p. 1173–1180.

TATON, T. A., MIRKIN, C. A., & LETSINGER, R. L. (2000). Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*. 289(5485). p. 1757-1760.

TERAMOTO, S., SAWAKI, D., OKADA, S. & OUCHI, Y. (2000) Markedly increased plasma (1-3)-beta-D-glucan is a diagnostic and therapeutic indicator of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a non-AIDS patient. *Journal of medical microbiology*. 49 (4). p. 393-394.

TESINI, B. L., WRIGHT, T. W., MALONE, J. E., HAIDARIS, C. G., HARBER, M., SANT, A. J., NAYAK, J. L., & GIGLIOTTI, F. (2017). Immunization with *Pneumocystis* cross-reactive antigen 1 (Pca1) protects mice against *Pneumocystis* pneumonia and generates antibody to *Pneumocystis jirovecii*. *Infection and immunity*. 85(4). e00850-16.

THAXTON, C. S., ELGHANIAN, R., THOMAS, A. D., STOEVA, S. I., LEE, J. S., SMITH, N. D., SCHAEFFER, A. J., KLOCKER, H., HORNINGER, W., BARTSCH, G., & MIRKIN, C. A. (2009). Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines “undetectable” PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(44). p. 18437-18442.

THOMAS, C.F. Jr. & LIMPER, A.H. (2004) *Pneumocystis pneumonia*. *The New England journal of medicine*. 350 (24). p. 2487-2498.

THOMAS, J. C., & LIMPER, A. H. (1998). *Pneumocystis pneumonia*: clinical presentation and diagnosis in patients with and without acquired immune deficiency syndrome. *Seminars in respiratory infections*. 13(4). p. 289-295.

TIPIRNENI, R., DALY, K.R., JARLSBERG, L.G., KOCH, J.V., SWARTZMAN, A., ROTH, B.M., WALZER, P.D. & HUANG, L. (2009) Healthcare worker occupation and immune response to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging Infectious Diseases*. 15 (10) p. 1590-1597.

TOMÁS, A.L., CARDOSO, F., ESTEVES, F. & MATOS, O (2016) Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Scientific Reports*. 6:36287.

TOMÁS, A. L., DE ALMEIDA, M. P., CARDOSO, F., PINTO, M., PEREIRA, E., FRANCO, R. & MATOS, O. (2019) Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10:2917. doi: 10.3389/fmicb.2019.02917

TOMÁS, A. L., & MATOS, O. (2018) Current Advances in Laboratory Diagnosis. *OBM Genetics* 2(4).

TOMBLYN, M., CHILLER, T., EINSELE, H., GRESS, R., SEPKOWITZ, K., STOREK, J., WINGARD, J. R. & BOECKH, M. J. (2009). Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. *Bone marrow transplantation*. 44(8). p. 453.

TOTET, A., PAUTARD, J.C., RACCURT, C., ROUX, P. & NEVEZ, G. (2003) Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jiroveci* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*. 41. p. 1173-1180.

TSOLAKI, A. G., MILLER, R. F., UNDERWOOD, A. P., BANERJI, S., & WAKEFIELD, A. E. (1996). Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*. 174(1). p. 141-156.

TURKEVICH, J., STEVENSON, P. C., & HILLIER, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 11. p. 55-75.

VARGAS, S. L., HUGHES, W. T., SANTOLAYA, M. E., ULLOA, A. V., PONCE, C. A., CABRERA, C. E., CUMSILLE, F., & GIGLIOTTI, F. (2001). Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clinical infectious diseases*. 32(6). p. 855-861.

VAVRA, J. & KUCENA, K. (1970) *Pneumocystis carinii delanoë*, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *The Journal of protozoology*. 17 (3). p. 463-83.

VINDRIOS, W., ARGY, N., LE GAL, S., LESCURE, F. X., MASSIAS, L., LE, M. P., WOLFF, M., YAZDANPANAH, Y., NEVEZ, G., HOUZE, S., DORENT, R., LUCET, J. C. (2017). Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* Infection Among Heart Transplant Recipients: Molecular Investigation and Management of an Interhuman Transmission. *Clinical Infectious Diseases*. 65(7). p. 1120-1126.

VOGEL, M., WEISSGERBER, P., GOEPPERT, B., HETZEL, J., VATLACH, M., CLAUSSEN, C. & HORGER, M. (2011) Accuracy of serum LDH elevation for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Swiss Medical Weekly*. 141.

VOSSEN, M.E., BECKERS, P.J., MEUWISSEN, J.H. & STADHOUDERS, A.M. (1978) Developmental biology of *Pneumocystis carinii*, and alternative view on the life cycle of the parasite. *Zeitschrift für parasitenkunde*. 55 (2). p. 101-118.

WAKEFIELD, A. E. (1996). DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *Journal of clinical microbiology*. 34(7). p. 1754-1759.

WAKEFIELD, A. E., LINDLEY, A. R., AMBROSE, H. E., DENIS, C. M., & MILLER, R. F. (2003). Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in human immunodeficiency virus–infected patients. *The Journal of infectious diseases*. 187(6). p. 901-908.

WAKEFIELD, A. E., STEWART, T. J., MOXON, E. R., MARSH, K., & HOPKIN, J. M. (1990a). Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84(6). p. 800-802.

WAKEFIELD, A.E., PIXLEY, F.J., BANERJI, S., SINCLAIR, K., MILLER, R.F., MOXON, E.R. & HOPKIN, J.M. (1990b) Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*. 336 (8713). p. 451-453.

WALZER, P. D. (1994) Pathogenic Mechanisms. In: Walzer PD (ed) *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2nd edn, p(251-265). New York: Marcel Dekker.

WALZER, P.D., DJAWE, K., LEVIN, L., DALY, K.R., KOCH, J., KINGSLEY, L., WITT, M., GOLUB, E.T., BREAM, J.H., TAIWO, B. & MORRIS, A. (2009) Long-term serologic responses to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in HIV-positive individuals with and without *P. jirovecii* infection. *Journal of Infectious Diseases*. 199 (9). p. 1335-1344.

WANG, Z., LÉVY, R., FERNIG, D. G., & BRUST, M. (2006). Kinase-catalyzed modification of gold nanoparticles: a new approach to colorimetric kinase activity screening. *Journal of the American Chemical Society*. 128(7). p. 2214-2215.

WANG, E. H. Z., PARTOVI, N., LEVY, R. D., SHAPIRO, R. J., YOSHIDA, E. M., & GREANYA, E. D. (2012). *Pneumocystis* pneumonia in solid organ transplant recipients: not yet an infection of the past. *Transplant Infectious Disease*. 14(5). p. 519-525.

WEINBERG, G. A., & DURANT, P. J. (1994). Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* derived from infected rats, mice, ferrets, and cell cultures. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 41(3). p. 223-228.

WILSON, R. (2008). The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chemical Society Reviews*. 37(9). p. 2028-2045.

WORKMAN, S., WELLS, S. K., PAU, C. P., OWEN, S. M., DONG, X. F., LABORDE, R., & GRANADE, T. C. (2009). Rapid detection of HIV-1 p24 antigen using magnetic immuno-chromatography (MICT). *Journal of virological methods*. 160(1-2). p. 14-21.

WORODRIA, W., OKOT-NWANG, M., YOO, S. D. & AISU, T. (2003). Causes of lower respiratory infection in HIV-infected Ugandan adults who are sputum AFB smear-negative. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 7. p. 117-123.

WRIGHT, T. W., & GIGLIOTTI, F. (2005) Mechanisms of Lung Injury During *Pneumocystis* Pneumonia. In: Walzer PD, Cushion MT (eds) *Pneumocystis* Pneumonia, 3rd edn, p(327-348). New York: Marcel Dekker, New York.

WRIGHT, T. W., GIGLIOTTI, F., FINKELSTEIN, J. N., MCBRIDE, J. T., AN, C. L., & HARMSSEN, A. G. (1999). Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *The Journal of clinical investigation*. 104(9). p. 1307-1317.

YOSHIDA, Y. (1989). Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *The Journal of protozoology*. 36. p. 53-60.

YOSHIKAWA, H., MORIOKA, H., & YOSHIDA, Y. (1987). Freeze-fracture studies on *Pneumocystis carinii*. *Parasitology research*. 73(2). p. 132-139.



YOUNG, J. A., STONE, J. W., MCGONIGLE, R. J., ADU, D., & MICHAEL, J. (1986). Diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia by cytological examination of bronchoalveolar lavage fluid: report of 15 cases. *Journal of clinical pathology*. 39(9). p. 945-949.

YOUNG, K. R., RANKIN, J. A., NAEGEL, G. P., PAUL, E. S., & REYNOLDS, H. Y. (1985). Bronchoalveolar lavage cells and proteins in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: an immunologic analysis. *Annals of internal medicine*. 103(4). p. 522-533.

YU, C., & IRUDAYARAJ, J. (2007). Multiplex biosensor using gold nanorods. *Analytical chemistry*. 79(2). p. 572-579.

ZAMAN, M. K., WOOTEN, O. J., SUPRAHMANYA, B., ANKOBIAH, W., FINCH, P. J., & KAMHOLZ, S. L. (1988). Rapid non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* from induced liquefied sputum. *Annals of Internal Medicine*. 109. p. 7-10.

ZHENG, Y., HONG, Y., WU, W., SUN, D., WANG, Y., HUANG, J., & LI, Q. (2015). Separation of different shape biosynthesized gold nanoparticles via agarose gel electrophoresis. *Separation and Purification Technology*. 151. p. 332-337.



## Capítulo 2.

### **Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii***

Este capítulo corresponde ao artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica:

**TOMÁS, A. L., CARDOSO, F., ESTEVES, F. & MATOS, O (2016)** Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Scientific Reports*. 6:36287.

**Anexo I** – Material suplementar deste artigo, disponível online em <https://www.nature.com/articles/srep36287>



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*

Received: 21 June 2016  
Accepted: 13 October 2016  
Published: 08 November 2016

A. L. Tomás<sup>1</sup>, F. Cardoso<sup>1</sup>, F. Esteves<sup>2</sup> & O. Matos<sup>1</sup>

Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* (PcP) relies on the detection of *P. jirovecii* in respiratory specimens obtained by invasive techniques. Thus, the development of a serological test is urgently needed as it will allow the diagnosis of PcP using blood, an inexpensive and non-invasive specimen. This study aims to combine the production of a multi-epitope synthetic recombinant antigen (RSA) and an ELISA test for detection of anti-*P. jirovecii* antibodies, in order to develop a new approach for PcP diagnosis. The RSA was selected and designed based on the study of the immunogenicity of the carboxyl-terminal domain of the major surface glycoprotein. This antigen was purified and used as an antigenic tool in an ELISA technique for detection of Ig, IgG and IgM antibodies anti-*P. jirovecii* (patent-pending no. PT109078). Serum specimens from 88 patients previously categorized in distinct clinical subgroups and 17 blood donors, were analysed. The IgM anti-*P. jirovecii* levels were statistically increased in patients with PcP ( $p = 0.001$ ) and the ELISA IgM anti-*P. jirovecii* test presented a sensitivity of 100% and a specificity of 80.8%, when associated with the clinical diagnosis criteria. This innovative approach, provides good insights about what can be done in the future serum testing for PcP diagnosis.

*Pneumocystis jirovecii* is an atypical opportunistic fungus capable of causing severe interstitial pneumonia that remains the leading AIDS-defining illness in European countries and the USA<sup>1–3</sup>. Furthermore, PcP is an emerging concern in immunosuppressed non-HIV-infected patients subjected to immunosuppressive therapies due to cancer, organ transplant or autoimmune diseases<sup>4,5</sup>.

The standard laboratory diagnosis of PcP relies on microscopic visualization of stained *P. jirovecii* organisms and/or DNA detection by PCR in respiratory specimens, such as bronchoalveolar lavage (BAL). These specimens are obtained by invasive techniques that carry an associated risk of complications and are not easy to perform in patients with respiratory failure or in children<sup>6</sup>. Therefore, development of a serological test is urgently needed, as it will allow the diagnosis of PcP using minimally invasive samples, such as blood.

In the past few decades, many serological methods have been studied for use in the diagnosis of PcP. Elevated serum levels of the lactate dehydrogenase (LDH), (1–3)- $\beta$ -D-glucan and Krebs von den Lungen-6 antigen (KL-6), as well as low serological levels of S-adenosylmethionine (SAM), have been related to PcP and proposed as markers of the disease<sup>7–15</sup>. However, the use of these metabolites in PcP diagnosis is complex because their serum levels are not strictly specific to *P. jirovecii* infection.

Alternatively, promising studies using recombinant antigens of *P. jirovecii* and antibody immunodetection techniques, such as immunoenzymatic or immunoblotting assays, have shown potential application in the diagnosis and epidemiological studies of PcP<sup>16–26</sup>. The *Pneumocystis* antigen that has received the most attention is the major surface glycoprotein (Msg), which contains shared and species-specific epitopes, elicits humoral and

<sup>1</sup>Unidade de Parasitologia Médica, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Global Health and Tropical Medicine, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup>Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana (ToxOmics), Departamento de Genética, NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.M. (email: omatos@ihmt.unl.pt)

Parameters	Number of patients (%)
Immunodeficiency state	
HIV-infected	75 (85.23)
Organ/marrow transplanted	6 (6.82)
Cancer	7 (7.95)
PcP laboratory diagnosis	
IF/Mab+	28 (35)
PCR+	61 (75)
IF/PCR+	28 (35)
Fungal burden	
Negative for <i>P. jirovecii</i>	27 (30.7)
Low/Moderate	49 (55.7)
High	12 (13.6)
PcP final diagnosis	
Patient with PcP	50 (56.82)
Patient colonized with <i>P. jirovecii</i>	11 (12.5)
Patient without <i>P. jirovecii</i> or other fungal infection	19 (21.59)
Patient without <i>P. jirovecii</i> infection with other fungal infection	8 (9.09)

**Table 1.** Clinical, immunological and laboratory information of the 88 patients previously studied, with suspicion of PcP.

cellular protective immune responses and plays a central role in the interaction of *Pneumocystis* with its host<sup>27</sup>. The carboxyl-terminal domain of the Msg is reported to be highly immunogenic, the most conserved and reactive region of Msg and to contain both B and T cell conserved protective epitopes<sup>16,18,23–25</sup>. Therefore, recombinant synthetic amino acid sequences, designed to hold more than one reactive region of the Msg, are promising tools that can increase the sensitivity, specificity, the cost-effectiveness and the standardization of serological tests<sup>28</sup>.

This study aims to: (1) produce a multi-epitope synthetic recombinant antigen (RSA) of *P. jirovecii*'s Msg; (2) optimize an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the detection of anti-*P. jirovecii* Ig, IgM and IgG antibodies, in order to use the *P. jirovecii* RSA as biosensor in the serologic diagnosis of PcP.

## Materials and Methods

**Clinical samples.** A total of 105 serum specimens were analysed in a retrospective observational study with the purpose to evaluate the reliability of the ELISA developed. Eighty-eight sera were from patients attending hospitals in the Lisbon area, between 2010 and 2013, whose specimens were submitted to our laboratory with the purpose of routine diagnosis of PcP with the patients' informed consent and according to the routine institutional procedures. Patients' demographic data were kept in confidence and were coded for the authors of the study. Only laboratory results, clinical diagnosis of PcP and immunosuppression status were revealed and are summarized in Table 1. Seventeen blood donors' serum specimens were studied to provide a control group.

The clinical diagnosis of PcP was established when at least two of the following variables were present: symptoms such as unproductive cough, fever and dyspnea; arterial partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>) lower than 65 mmHg; chest radiographs presenting fine bilateral, perihilar interstitial shadowing<sup>6,29,30</sup>.

*P. jirovecii* burden was quantified by scoring the number of cysts observed in respiratory specimens by applying the semi-quantitative method of IF/Mab and was defined as: low to moderate (one to three cysts in one field at x1,000), and heavy (four or more cysts in one field at x1,000), as described previously<sup>31</sup>.

The serum specimens enrolled in this study were from patients' previously categorized in five distinct clinical subgroups by detection of *P. jirovecii* in their respiratory specimens by indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies (IF/MAB) and nested-PCR (nPCR), as described previously<sup>32</sup>. Serum specimens from patients with PcP (positive IF/MAB, positive nPCR), patients colonized with *P. jirovecii* (negative IF/MAB, positive nPCR, asymptomatic), patients without *P. jirovecii* or other fungal infections (negative IF/MAB and nPCR), patients without *P. jirovecii* infection but with other fungal diseases (negative IF/MAB and nPCR, presence of other fungi) and from blood donors (healthy persons), were analysed.

The protocol for this study was approved by the ethical committee from Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal) that, because this was a retrospective observational study, waived informed consent. The methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

**Selection and cloning of the recombinant synthetic antigen (RSA) sequence.** The multi-epitope RSA was designed based on the study of the immunogenicity of the *P. jirovecii*'s MSG gene, described previously (GenBank accession no. AF033211 and JN792933.1)<sup>33,34</sup>. The selection of the putative reactive epitopes of the Msg was made targeting the terminal fraction of its middle portion (MsgB) and all its terminal portion (MsgC), using bioinformatics approaches to analyse electrochemical properties, secondary structure prediction, polarity, relative position to the membrane and hydrophobicity profile of the specific polypeptides at the online software ExPASy – ProtScale and CBS – TMHMM – version 2.0, as previously described<sup>28</sup>. In addition, only



the most conserved regions, presenting high similarity with the sequences previously reported in GenBank for *Pneumocystis*’ Msg protein, were considered for the final selection of the RSA.

Three potential immunogenic regions with high predicted antigenicity and reactivity were chosen and a short oligonucleotide sequence containing these three epitopes, interconnected by two bridges of five glycine residues, was synthesized and cloned into the plasmid pUC57-Amp vector by Nzytech®. The inserts sequence was confirmed by sequencing (ABI 3730XL sequencer, Stabvida®). Several physical and chemical parameters of the RSA were determined using the online tool Expasy – ProtParam.

After the RSA synthesis process into pUC57-Amp, the vector was cloned into CaCl<sub>2</sub> competent *E. coli* TOP10 by heat shock, in a proportion of 0.1 µg/µl, in order to obtain high copy number of plasmids<sup>35,36</sup>.

**Expression and purification of the Recombinant Synthetic Antigen.** The RSA was cloned in the expression vector pLATE 31, from aLICator LIC Cloning and Expression Kit 3 (#K1261, Thermo Scientific®), according to manufacturer’s instructions. This vector was used to clone CaCl<sub>2</sub> competent *E. coli* BL21 Star (DE3) cells by heat shock. The process enabled the synthetic production of the RSA with a polyhistidine tail end (6xHis), allowing its purification by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) with Nickel ions<sup>37</sup>.

The transformed *E. coli* BL21 Star (DE3) cells were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth containing 50 mg/ml of ampicillin, until an absorbance of 0.5 at 600 nm. The RSA expression was then induced by incubation with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 1 mM (3 h at 37 °C). An expression control for each colony was created in the absence of IPTG. The pellets were harvested by centrifugation at 5000 g for 5 minutes at room temperature after the induction period.

For purification of the RSA, the cell pellets from 15 ml of induced cultures were resuspended in 6 ml of lysis buffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 20 mM imidazole, 0.1 mM PMSF, 0.5 M NaCl, 0.2% Triton X-100) for 10 minutes and then subjected to a thermal shock with three cycles of boiling (95–100 °C) for 5 minutes, followed by cooling on ice (0 °C) for 5 minutes. The supernatants were recovered by centrifugation at 15,700 g for 5 minutes.

The supernatants were transferred into a mini-column polyprep (Biorad®), prepared with a histidine chelating resin with a ratio of 6 mL of sample to 1 mL of resin 50% (Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, GE Healthcare®), and incubated for 2 h at room temperature. The column was washed three times with 1 mL of ligation buffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM NaCl, 20 mM imidazole [pH = 7.4]), and the recombinant protein was then eluted eight times with 0.5 mL of elution buffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM NaCl, 500 mM imidazole [pH = 7.4]). The eluted proteins were desalted with a desalting membrane (D-0655, Sigma®), as described elsewhere<sup>28</sup>. The protein concentration of the RSA was determined (Nanodrop 1000, Thermo Scientific®) and a final concentration of 10 µg/ml was obtained by diluting the RSA (1:40) with sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>, 50 mM [pH 8.4]).

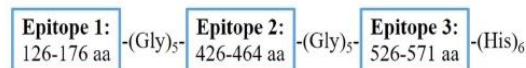
**SDS-PAGE and ELISA analysis.** The eluted RSA was analysed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 15% acrylamide gels (mini-PROTEAN electrophoresis cell, Biorad®; EC4000P, Apparatus®) and by indirect ELISA, using anti-polyhistidine antibodies, in order to confirm the protein expression and purification of the antigen.

The purified RSA was applied as a tool in an indirect ELISA technique. The ELISA was optimized for detection of IgG, IgM and IgA antibodies anti-*P. jirovecii*. In an ELISA plate (Greiner®), 50 µl of the RSA was added to the flat transparent wells. The synthetic antigen was coated to the plate for 18 hours at 4 °C. The plate was washed with PBS and 70 µL of 1% PVA were added to the wells and incubated for 1 hour at room temperature (20–25 °C). After blocking, PVA was removed from the plate without washing. Then, the plate was incubated with 50 µl of serum samples (1:80 dilution in PBS with 0.05% Tween 20 and 0.5% BSA) at 37 °C for 1 hour. The plate was washed (three times) with washing buffer PBS-Tween 20 ([PBS-T] - 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4]; 0.05% Tween 20) and with distilled water (one time). At that point, the specific anti-human Ig (anti-human immunoglobulin [A3813 1:10000 diluted, Sigma®], or anti-human immunoglobulin M [2020-04 1:3000 diluted, Sigma®], or anti-human immunoglobulin G [2040-04 1:3000 diluted, Sigma®]) conjugated to alkaline phosphatase, was added to the wells and incubated for 1 hour at 37 °C. After washing, colour was developed by the addition of 50 µl of the substrate solution containing 4-nitrophenylphosphate sodium salt (10 mg/mL, AppliChem®). The plate was incubated for 1 hour at room temperature and the optical densities were measured at 405 nm with an automatic microplate reader (Infinite 200 Pro, Tecan®). ELISA results were determined for each serum sample in duplicate.

**Statistical analysis of data.** The analysis of the data allowed to evaluate the reliability of the ELISA developed, using statistical measures such as sensitivity, specificity, negative and positive predictive values and Receiver Operator Curves (ROC). The chi-square test ( $\chi^2$ ) and Fisher’s exact test were used, to study the association between two qualitative variables. The Mann-Whitney test was applied to determine the difference between the distributions of values of the different antibodies used, when we compared two groups of patients. This test was replaced by Kruskal-Wallis test, when comparing more than two groups of patients. Statistical tests were applied with a confidence level of 95%. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to perform the statistical analysis.

## Results

**Sampling characterization.** This study analysed serum specimens from a universe of 105 persons who were previously categorized into five groups. 50 serum specimens from patients with PcP (47.62%), 11 serum specimens from patients colonized with *P. jirovecii* (10.48%), 19 serum specimens from patients without *P. jirovecii* or other fungal infections (18.09%), eight serum specimens from patients without *P. jirovecii* infection but with other fungal diseases (7.62%) and 17 serum samples from blood donors (16.19%), were analysed (Table 1).



**Figure 1. Msg RSA.** Representation of the multi-epitope RSA of *P. jirovecii*'s Msg designed in this study. MSG<sub>1696-1851</sub> (126-176 aa) is located at the terminal fraction of the MsgB portion, while MSG<sub>2596-2712</sub> (426-464 aa) and MSG<sub>2896-3033</sub> (526-571 aa) are integrated at the C-termini of the MsgC portion, according to the sequence with GenBank accession no. JN792933.1.

**Recombinant synthetic antigen production and purification.** A sequence of 582 amino acids corresponding to the terminal fraction of the Msg of *P. jirovecii* (assembling the terminal portion of the MsgB fraction and the entire MsgC fragment) was assessed. Through the *in silico* analysis of hydrophilicity, accessibility, flexibility, secondary structure, and polarity for this specific sequence, three potential epitopes with high predicted antigenicity and reactivity were selected (Fig. 1). The three potential immunogenic regions selected, Msg<sub>1696-1851</sub> (126-176 aa) which is located at the terminal fraction of the MsgB portion, Msg<sub>2596-2712</sub> (426-464 aa) and Msg<sub>2896-3033</sub> (526-571 aa), both integrated at the C-termini of the MsgC portion, were identified according to the sequence with GenBank accession no. JN792933.1 (see supplemental Figures S1-3). This three regions presented high hydrophilic profiles and were located at relatively conserved regions of the Msg sequence.

The *P. jirovecii* multi-epitope RSA designed is composed by 152 amino acids (136 aa from the three selected regions of the Msg original sequence, 10 glycines from the two ligation bridges residues and six histidines from the polyhistidine tail end), have a molecular weight of 16.7 kDa and an isoelectric point of 8.57. The online tool ExPASy - ProtParam characterizes this RSA as stable, with an estimated half-life in *E. coli* higher than 10 hours and a hydropathicity index of -0.702.

After expression of the RSA by *E. coli* BL21 Star (DE3) cells, an electrophoresis of proteins by SDS-PAGE was carried out. The stimulated bacteria expressed a fragment corresponding to the RSA size (16.7 kDa) and this fragment was absent in the control cells.

The RSA was then purified by IMAC and the products were analysed by SDS-PAGE. The products obtained in the elution buffer fractions, showed intense bands corresponding to the molecular weight of the *P. jirovecii* RSA.

**Detection/quantification of anti-*P. jirovecii* antibodies in human serum.** The serum samples were tested by ELISA. Therefore, each sample was subjected to three separate ELISA tests for detecting human anti-*P. jirovecii* antibodies: IgG and IgM. Figure 2 depicts the statistical analysis testing the differences in the distribution of the medians obtained in ELISA assays between the groups of patients studied.

The medians distribution of the different antibodies studied by ELISA were also analysed according to the parasite load and the immunosuppression status of the subjects. It was observed an increase in IgM antibodies with increased parasitic load ( $p = 0.004$ ). It was also observed that the distribution of the IgM class varies between HIV- and non-HIV-infected patients ( $p = 0.003$ ), being more pronounced in the HIV-infected ones.

Figure 3 shows a comparative study of the performance of the three ELISA assays, by representing the ROC curve for each ELISA test. The ROC curves analysis, demonstrates that the ELISA IgM anti-*P. jirovecii* test scored the most promising results. To determine the optimal cut-off limit of this test for the diagnosis of PcP, four different cut-off values were screened and evaluated, as described in Table 2.

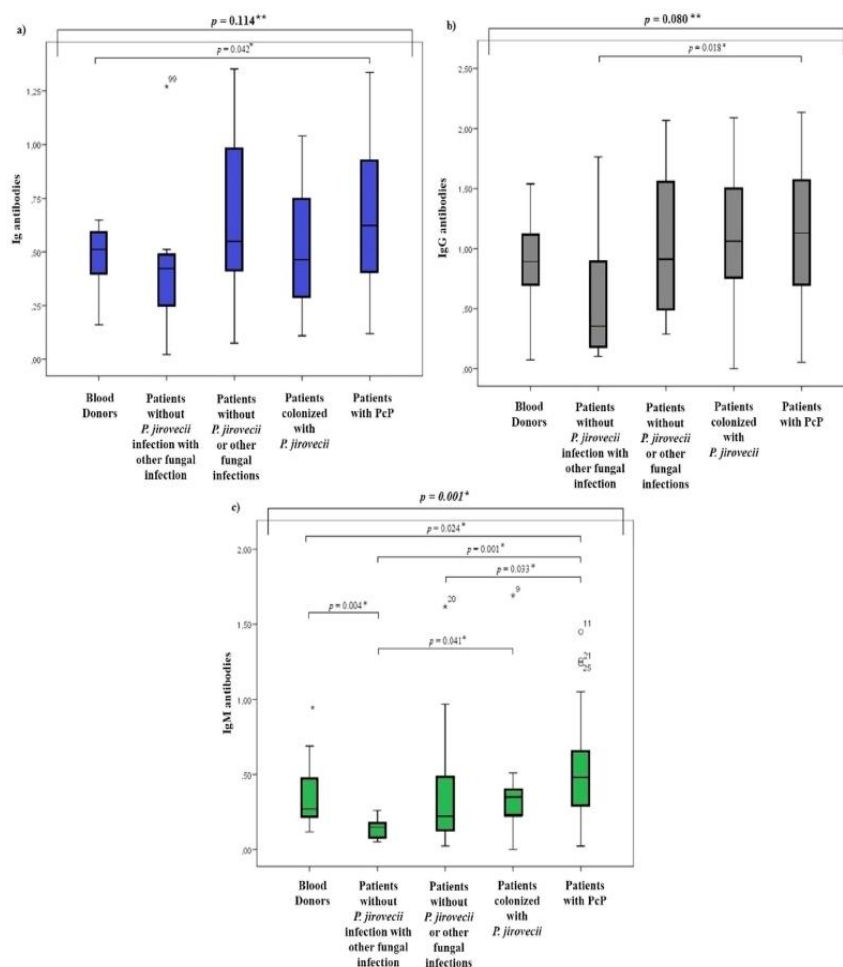
The ELISA IgM anti-*P. jirovecii* assay showed an optimal cut-off of 0.350 Abs at 405 nm, with 68% sensitivity and 61.8% specificity ( $p = 0.002$ ). However, these values alone do not exhibit reliability for the serological diagnosis of PcP. Therefore, the diagnostic usefulness of the IgM anti-*P. jirovecii* indirect ELISA was studied in association with the clinical diagnostic criteria for PcP: a PcP case was defined as a patient that met the clinical diagnostic criteria for PcP, plus had anti-*P. jirovecii* IgM antibodies levels equal to or higher than 0.35 absorbance units (AU). A PcP-negative case was defined as a patient that did not met the clinical diagnostic criteria for PcP and demonstrated anti-*P. jirovecii* IgM antibodies levels lower than 0.35 AU. A case was labelled undetermined when the clinical parameters and the anti-*P. jirovecii* IgM antibodies test yielded contradictory results. The sensibility, specificity, positive and negative predictive values were assessed based on cases with agreement between ELISA test result and clinical diagnosis (Table 3).

## Discussion

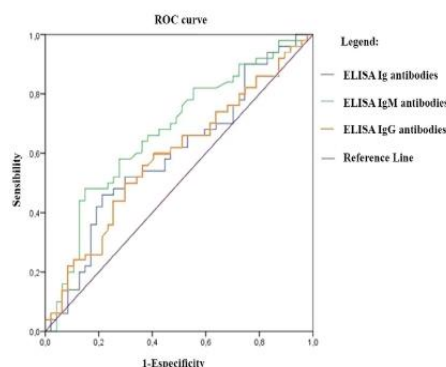
Currently, the definitive diagnosis of PcP involves the direct identification of *P. jirovecii* in respiratory specimens, particularly in BAL, the standard biological specimen, and therefore the most used. BAL is obtained by performing an expensive and invasive technique (bronchoscopy) that often is difficult to perform in patients with respiratory failure or in children<sup>6</sup>. In this perspective, it is urgent to develop a method minimally invasive, cost-effective, accurate and based on serological biomarkers, for diagnosis of PcP infection.

Serum LDH enzyme, the  $\beta$ -glucan structural component, antigen KL-6 and S-adenosylmethionine (SAM), have been associated with PcP<sup>7-15</sup>. However, despite their utility, all these serological markers are not narrowly specific for *P. jirovecii* infection. The LDH may be increased in any other pathology with cell damage, while  $\beta$ -glucan, as a structural component of fungi, may be increased in patients with other fungal infections. The KL-6 antigen, being a constituent of the alveolar type II pneumocytes, may also change its levels in any other pathology that causes injury to the lung parenchyma. Moreover, the applicability of serum levels of SAM are raising contention among various authors, not being well defined the relationship between the variation of serum levels of SAM and the infection caused by *P. jirovecii*. On top of this, even using the  $\beta$ -glucan, which is the serological marker that has shown more promising results, there is still no consensus cut-off for the diagnosis of PcP<sup>14</sup>.





**Figure 2. Statistical analysis of the antibodies distribution.** Box-and-whisker plots showing the levels distribution of Ig [(a)], IgG [(b)] and IgM [(c)] antibodies anti-*P. jirovecii* in serum of different patient groups studied, with representation of the statistic value ( $p$ ) with no statistical significance (\*\*) and with statistical significance (\*).



**Figure 3. ROC curves of ELISA assays.** Representation of ROC curves for the three different ELISA assays (Ig, IgM and IgG antibodies) performed in this study. Areas under the curve were determined with a 95% confidence interval and were 61.2% for total antibodies ( $p = 0.047$ ), 70.7% for IgM antibodies ( $p < 0.001$ ) and 61.4% for IgG antibodies ( $p = 0.044$ ). All the results were statistically significant ( $p < 0.05$ ), rejecting the hypothesis that the distribution of these antibodies is the same for patients with and without PcP.

Statistical measures	Cut-off values			
	0.250 (Abs)	0.286 (Abs)	0.300 (Abs)	0.350 (Abs)
Sensitivity (%)	82.0%	76.0%	72.0%	68.0%
Specificity (%)	52.7%	56.4%	58.2%	61.8%
Positive predictive value (%)	61.2%	61.3%	61.0%	61.8%
Negative predictive value (%)	76.3%	72.1%	69.6%	68%
Chi-square <i>p</i> value	0.001	0.001	0.002	0.002

**Table 2.** Statistical measures calculated for different cut-offs studied.

Statistical measures	Cut-off
	0.350 (Abs)
Sensitivity (%)	100
Specificity (%)	80.8
Positive predictive value (%)	87.5
Negative predictive value (%)	100
Chi-square <i>p</i> value	<0.001
Cases with agreement between ELISA test result and clinical diagnosis (%)	58.1

**Table 3.** Statistical measures for the association of ELISA IgM anti-*P. jirovecii* test results with the patient clinical diagnoses of PcP.

In the state of art of serological diagnosis of PcP, different authors have studied the immune response of patients with and without PcP with different fractions of the recombinant protein Msg of *P. jirovecii*<sup>16–26</sup>. Although there are an estimated 100 related but unique copies of the MSG gene in the *Pneumocystis* genome, a greater variability is notice in the amino-terminus of the Msg protein and the most conserved sequences are present at the carboxyl-terminus. Therefore, the carboxyl-terminus, especially the MsgC portion, appears to be the most useful portion for application in the immunodiagnosis and epidemiological studies of PcP<sup>9–18,16,23,24,34</sup>. However, an approach where targeting antigenic regions of the terminal portion of the Msg protein to improve discrimination between patients with and without PcP, was never tried before. Therefore, we designed a Msg RSA composed by three potential epitopes with high predicted antigenicity and reactivity (see supplemental Figures S4–S9 and Table S1). To ensure higher coverage of the potential epitopes existing in the terminal portion of Msg, the fraction between the amino acids 441–1022 was considered for the design and construction of the final RSA. This specific fraction of the MSG gene (between nucleotides 1321–3192) englobes the terminal sequence of the MsgB portion and the entire MsgC portion.

The selection of the three specific epitopes was based on the compartmental analysis of each theoretical reactive region, and the most hydrophilic, antigenic, flexible and reactive ones were considered potential antigenic epitopes. On the other hand, the selected epitopes were located at relative conserved regions as can be seen in the supplementary Figure S3. Besides this, epitopes nearby the C-termini of the MsgC protein were preferably chosen, because C-termini of proteins are often exposed and have a high degree of flexibility, making them usually a good choice for generating anti-peptide antibodies directed against the intact protein<sup>38</sup>. In summary, the selected potential reactive epitopes of the RSA present high predicted antigenicity and reactivity, are located in relatively conserved regions and represent the terminal fraction of the MsgB and the C-termini of the MsgC.

Although other potential antigenic epitopes were widely distributed along the entire amino acid sequence of the MsgC fragment, none were chosen because we were looking for a small and simple RSA, to make an initial assessment of the utility of this approach for the serological diagnosis of PPC.

On the other hand, since few previous studies analysed IgG and IgM fractions produced against recombinant fractions of Msg, in this study, ELISA assays were developed to attempt to understand if this RSA can be recognized by human antibodies (Ig, IgG and IgM), allowing the discrimination of persons with and without the disease. In the analysis of Fig. 2a, it can be observed an increase in Ig antibody levels of patients with PcP. However, this increase was not statistically significant ( $p = 0.114$ ) compared to the Ig antibodies medians of the other groups. Yet, there was a significant difference between the median values of blood donors' total antibodies and PcP patients, so the application of this test may be useful in distinguishing healthy persons from PcP patients ( $p = 0.042$ ). In Fig. 2b, there was an increase in production of IgG in patients with PcP, however the difference to the value recorded in other groups was not statistically significant ( $p = 0.080$ ). Though, there was statistical significance between the IgG median values of patients with other fungal pathologies and patients with PcP ( $p = 0.018$ ), demonstrating the potential utility of this serological marker as a discriminatory tool between *Pneumocystis* and other fungal infections. In Fig. 2c, there was a statistically significant difference ( $p = 0.001$ ) between the IgM antibodies median values among the five groups analysed, which indicates that the distribution of the IgM class is not random between different clinical groups. More important was the existence of statistical significance between the IgM median of PcP patients compared to healthy persons and the other patients groups, showing that this test has application in the discrimination of these different clinical conditions.



The absence of statistical significance between the medians of the Ig antibodies anti-*P. jirovecii* of the different groups, could be due to the lack of significance between IgG medians values, which compromised the results obtained with Ig antibodies. However, these results go against recent studies in which IgG levels to various recombinant fractions of MsgC were higher in HIV-infected patients with a history of PcP, compared to patients with no clinical history of PcP<sup>16,18,19,21–24</sup>. This circumstance may be due to the fact that the region analysed in this study was not identical to the regions examined by other authors, since we synthesized a RSA of the terminal portion of Msg. Moreover, the lack of sensitivity for detection of IgG antibodies by our ELISA technique may also explain these differences. Yet, the present study shows that there is indeed a difference in the levels of IgM antibodies between patients with PcP and the other groups analysed.

Figure 3 shows the ROC curves, the graphic representation of the true positive rate against the false positive rate for the different cut-offs of a test. In this study, despite all ELISA tests have achieved an area under the curve (AUC) with statistical significance ( $p < 0.05$ ), the IgM anti-*P. jirovecii* assay is the one with the most promising result ( $p < 0.001$ ), presenting an AUC of 70.7%. Then, the ELISA test with detection of IgM antibodies anti-*P. jirovecii* seems to show some applicability to the serological diagnosis of PcP and so we needed to test its reliability and sturdiness. An ideal test is the one that is able to identify all cases of disease being highly sensitive. At the same time, a perfect test should still be able to correctly identify all the people who do not have the disease, being specific to the pathology. Therefore, a cut-off value for this ELISA test, that balances the sensitivity and specificity needed, was chosen (Table 2). The results obtained for the different cut-off values confirmed that the best balance between sensibility and specificity was recorded at the cut-off value of 0.350 AU. With this cut-off value, the test will be negative in 61.8% of patients without PcP and it will be positive in 68% of patients with PcP. However, this cut-off value, as well as the other three studied, show no statistical measures of excellence that allow us to ensure a serological diagnosis of PcP with complete confidence. Yet, the data presented in Table 3, where the results of the ELISA test for IgM antibodies anti-*P. jirovecii* were associated with the clinical diagnosis of PcP of each patient, showed promising results for the serological diagnosis of PcP.

If we look at this association as a screening test, we can classify the patients to the condition of having or not PcP, with a sensitivity of 100% and a specificity of 80.8%. The positive and negative predictive values stood at 87.5% and 100%, respectively, and the statistic test leaves no doubt about the dependency of the results of the ELISA assay and the clinical diagnosis. Thus, the implementation of this test as a screening test could contribute to an improvement in health care, reducing the practice of empirical therapy, especially in low-middle income countries, in patients with respiratory failure and in children, in whom the execution of invasive techniques such as bronchoscopy are not easy to accomplish. Moreover, the association of the ELISA IgM anti-*P. jirovecii* assay with the clinical diagnosis of patients with suspected PcP, show great applicability in epidemiological studies. It will be possible to evaluate the population's immunity against the etiological agent of PcP, using a specific biosensor of *P. jirovecii* and a biological specimen (blood) obtained by a minimally invasive technique, sensitive and specific in diagnosing the disease.

With this innovative approach, we succeeded in producing a recombinant synthetic antigen, specific for *P. jirovecii*, capable of functioning as a PcP biosensor when applied in an ELISA assay for detection of IgM antibodies anti-*P. jirovecii* (patent-pending no. PT109078) and when associated with the clinical diagnosis of each patient. This new method may be used as a screening test for PcP, decreasing the need for biological specimens obtained by invasive techniques, which is a major benefit to the patient's care and an improvement in the clinical management of the disease.

## References

1. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. *HIV/AIDS surveillance in Europe 2014*. Stockholm: ECDC (2015).
2. Hughes, W. T. Historical overview. In Walzer, P. D., Cushion, M. T., editors. *Pneumocystis Pneumonia* (3rd Edition) Marcel Dekker, Inc. [chapter 1] (USA, 2005).
3. Huang, L. et al. HIV-associated *Pneumocystis pneumonia*. *Proc Am Thorac Soc*. **8**(3), 294–300 (2011).
4. Hughes, W. T. *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV-infected patients: update. In Walzer, P. D., Cushion, M. T., editors. *Pneumocystis Pneumonia* (3rd Edition) Marcel Dekker, Inc. [chapter 16] (USA, 2005).
5. Roux, A. et al. Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Med Mal Infect*. **44**(5), 185–198 (2014).
6. Barry, S. M. & Johnson, M. A. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. *HIV Med*. **2**(2), 123–132 (2001).
7. Hamada, H. et al. KL-6 as a serologic indicator of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised hosts. *Intern Med Tokyo, Japan* **37**(3), 307–310 (1998).
8. Teramoto, S., Sawaki, D., Okada, S. & Ouchi, Y. Markedly increased plasma (1–3)-beta-D-glucan is a diagnostic and therapeutic indicator of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a non-AIDS patient. *J Med Microbiol*. **49**(4), 393–394 (2000).
9. Tasaka, S. et al. Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Chest*. **131**(4), 1173–1180 (2007).
10. Skelly, M. J., Holzman, R. S. & Merali, S. S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clin Infect Dis*. **46**(3), 467–471 (2008).
11. Finkelman, M. A. *Pneumocystis jirovecii* infection: Cell wall (1–3)-D-glucan biology and diagnostic utility. *Crit Rev Microbiol*. **36**(4), 271–281 (2010).
12. Held, J., Koch, M. S., Reischl, U., Danner, T. & Serr, A. Serum (1–3)-beta-D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clin Microbiol Infect*. **17**(4), 595–602 (2011).
13. Morris, A. M. & Masur, H. A serologic test to diagnose *Pneumocystis pneumonia*: are we there yet? *Clin Infect Dis*. **53**(2), 203–204 (2011).
14. Esteves, F. et al. (1–3)-beta-D-glucan in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of *Pneumocystis pneumonia* (PcP) in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **33**(7), 1173–1180 (2014).
15. Esteves, F. et al. Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: evaluation of four serologic biomarkers. *Clin Microbiol Infect*. **21**(4), 379.e1–379.e10 (2015).
16. Daly, K. R. et al. Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jirovecii* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons. *J Infect Dis*. **186**(5), 644–651 (2002).

17. Bishop, L. R. & Kovacs, J. A. Quantitation of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in healthy persons and immunocompromised patients. *J Infect Dis.* **187**(12), 1844–1848 (2003).
18. Daly, K. R., Koch, J., Levin, L. & Walzer, P. D. Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis.* **10**(5), 848–854 (2004).
19. Daly, K. R., Koch, J. V., Shire, N. J., Levin, L. & Walzer, P. D. Human immunodeficiency virus-infected patients with prior *Pneumocystis pneumonia* exhibit increased serologic reactivity to several major surface glycoprotein clones. *Clin Vaccine Immunol.* **13**(10), 1071–1078 (2006).
20. Daly, K. R. *et al.* Geographical variation in serological responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein antigens. *Clin Microbiol Infect.* **15**(10), 937–942 (2009).
21. Tipirneni, R. *et al.* Healthcare worker occupation and immune response to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis.* **15**(10), 1590–1597 (2009).
22. Walzer, P. D. *et al.* Long-term serologic responses to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in HIV-positive individuals with and without *P. jirovecii* infection. *J Infect Dis.* **199**(9), 1335–1344 (2009).
23. Djawe, K. *et al.* Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. *PLoS One* **5**(12), e14259 (2010).
24. Gingo, M. R. *et al.* Serologic responses to *Pneumocystis* proteins in human immunodeficiency virus patients with and without *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **57**(3), 190–196 (2011).
25. Blount, R. J. *et al.* Serologic responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein among Uganda patients with respiratory symptoms. *PLoS One* **7**(12), e51545 (2012).
26. Djawe, K., Daly, K. R., Levin, L., Zar, H. J. & Walzer, P. D. Humoral immune responses to *Pneumocystis jirovecii* antigens in HIV-infected and uninfected young children with *Pneumocystis pneumonia*. *PLoS One* **8**(12), e82783 (2013).
27. Stringer, J. R. Surface Antigens. In Walzer, P. D., Cushion, M. T. editors *Pneumocystis Pneumonia* (3rd Edition) Marcel Dekker, Inc. (USA, [chapter 4] 2005).
28. Dai, J. *et al.* Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Vaccine Immunol.* **19**(3), 338–342 (2012).
29. Huang, L. Clinical Presentation and Diagnosis of *Pneumocystis Pneumonia* in HIV-Infected Patients. In Walzer, P. D., Cushion, M. T. editors *Pneumocystis Pneumonia* (3rd Edition) Marcel Dekker, Inc. (USA, [Chapter 15] 2005).
30. Thomas, C. F. Jr. & Limper, A. H. *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med.* **350**(24), 2487–2498 (2004).
31. Esteves, F. *et al.* Multicentre study highlighting clinical relevance of new high-throughput methodologies in molecular epidemiology of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* **22**(6), 566.e9–566.e19 (2016).
32. Esteves, F. *et al.* *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect* **14**, 356–362 (2008).
33. Garbe, T. R. & Stringer, J. R. Molecular characterization of clustered variants of genes encoding major surface antigens of human *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* **62**(8), 3092–3101 (1994).
34. Mei, Q. *et al.* Characterization of Major Surface Glycoprotein Genes of Human *Pneumocystis carinii* and High-Level Expression of a Conserved Region. *Infect Immun* **66**(9), 4268–4273 (1998).
35. Li, X. *et al.* An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. *Afric J Biotechnol.* **9**(50), 8549–8554 (2010).
36. Singh, M., Yadav, A., Ma, X. & Amoah, E. Plasmid DNA Transformation in *Escherichia Coli*: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl<sub>2</sub> Treated Cells. *Int J Biotechnol Biochem.* **6**(4), 561–568 (2010).
37. Block, H. *et al.* Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol.* **463**, 439–473 (2009).
38. Hancock, D. C. & O'Reilly, N. J. Synthetic peptides as antigens for antibody production. *Methods Mol Biol.* **295**, 13–26 (2005).

## Acknowledgements

This research was partially supported by the doctoral fellowship grant SFRH/BD/108433/2015 financed by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

## Author Contributions

O.M., F.C. and F.E. were responsible for the study design and the data analysis. A.L.T., F.C. and F.E. performed the experiments and the statistical analysis. O.M. was responsible for reagents/materials/analysis tools supplies. All authors contributed to the writing and approval of the final version of the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Tomás, A. L. *et al.* Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Sci. Rep.* **6**, 36287; doi: 10.1038/srep36287 (2016).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

## Capítulo 3.

### **Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care**

Este capítulo corresponde ao artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica:

**TOMÁS, A. L., DE ALMEIDA, M. P., CARDOSO, F., PINTO, M., PEREIRA, E., FRANCO, R. & MATOS, O.** (2019) Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10:2917. doi: 10.3389/fmicb.2019.02917

**Anexo II** – Material suplementar deste artigo, disponível online em

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02917/full#supplementary-material>







# Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care

Ana Luísa Tomás<sup>1,2</sup>, Miguel P. de Almeida<sup>3</sup>, Fernando Cardoso<sup>1</sup>, Mafalda Pinto<sup>2</sup>, Eulália Pereira<sup>3</sup>, Ricardo Franco<sup>2\*</sup> and Olga Matos<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jae-Hyuk Yu,  
University of Wisconsin-Madison,  
United States

### Reviewed by:

Jon Woods,  
University of Wisconsin-Madison,  
United States  
Soo Chan Lee,  
University of Texas at San Antonio,  
United States

### \*Correspondence:

Ricardo Franco  
ricardo.franco@fct.unl.pt  
Olga Matos  
omatos@ihmt.unl.pt

### Specialty section:

This article was submitted to  
Fungi and Their Interactions,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 04 November 2019

**Accepted:** 03 December 2019

**Published:** 19 December 2019

### Citation:

Tomás AL, de Almeida MP,  
Cardoso F, Pinto M, Pereira E,  
Franco R and Matos O (2019)  
Development of a Gold  
Nanoparticle-Based Lateral-Flow  
Immunoassay for *Pneumocystis*  
Pneumonia Serological Diagnosis  
at Point-of-Care.  
Front. Microbiol. 10:2917.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.02917

<sup>1</sup> Medical Parasitology Unit, Group of Opportunistic Protozoa/HIV and Other Protozoa, Global Health and Tropical Medicine, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa, Lisbon, Portugal, <sup>2</sup> UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal, <sup>3</sup> REQUIMTE/LAQV, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PcP) is a major human immunodeficiency virus (HIV)-related illness, rising among immunocompromised non-HIV patients and in developing countries. Presently, the diagnosis requires respiratory specimens obtained through invasive and costly techniques that are difficult to perform in all patients or implement in all economic settings. Therefore, the development of a faster, cost-effective, non-invasive and field-friendly test to diagnose PcP would be a significant advance. In this study, recombinant synthetic antigens (RSA) of *P. jirovecii*'s major surface glycoprotein (Msg) and kexin-like serine protease (Kex1) were produced and purified. These RSA were applied as antigenic tools in immunoenzymatic assays for detection of specific anti-*P. jirovecii* antibodies (IgG and IgM) in sera of patients with ( $n = 48$ ) and without ( $n = 28$ ) PcP. Results showed that only IgM anti-*P. jirovecii* levels were significantly increased in patients with PcP compared with patients without *P. jirovecii* infection ( $p \leq 0.001$  with both RSA). Thus, two strip lateral flow immunoassays (LFIA), based on the detection of specific IgM anti-*P. jirovecii* antibodies in human sera samples, were developed using the innovative association of *P. jirovecii*'s RSA with spherical gold nanoparticles (AuNPs). For that, alkanethiol-functionalized spherical AuNPs with ca. 40 nm in diameter were synthesized and conjugated with the two RSA (Msg or Kex1) produced. These AuNP-RSA conjugates were characterized by agarose gel electrophoresis (AGE) and optimized to improve their ability to interact specifically with serum IgM anti-*P. jirovecii* antibodies. Finally, two LFIA prototypes were developed and tested with pools of sera from patients with (positive sample) and without (negative sample) PcP. Both LFIA had the expected performance, namely, the presence of a test and control red colored lines with the positive sample, and only a control red colored line with the negative sample. These results provide valuable insights into the possibility

# Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care

Tomás et al.

Gold-Based Immunonanodiagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia

of PcP serodiagnosis at point-of-care. The optimization, validation and implementation of this strip-based approach may help to reduce the high cost of medical diagnosis and subsequent treatment of PcP both in industrialized and low-income regions, helping to manage the disease all around the world.

**Keywords:** *Pneumocystis* pneumonia, gold nanoparticles, point-of-care, lateral-flow immunoassay, serological diagnosis, major surface glycoprotein, kexin-like serine protease 1, synthetic recombinant antigens

## INTRODUCTION

The fungus *Pneumocystis jirovecii* is a pathogen able to cause a fatal pneumonia (PcP) in immunocompromised patients worldwide (Barry and Johnson, 2001; Huang et al., 2011; Esteves et al., 2014; Matos et al., 2017). In industrialized countries, the incidence of PcP has decreased with the widespread use of chemoprophylaxis and the introduction of combination antiretroviral therapy, but it still remains a serious clinical problem for human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients (Huang et al., 2011; Esteves et al., 2014; Matos et al., 2017; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)/WHO Regional Office for Europe, 2018). Likewise, the rising number of immunocompromised non-HIV-infected patients susceptible to *P. jirovecii* infection in these countries, warrants the need for improved diagnostic and treatment strategies (Hughes, 2005; Roux et al., 2014). In developing countries, where there is a lack of diagnostic resources and expertise, the number of PcP cases reported have been increasing significantly as more sensitive/specific laboratory methods are being used (Chakaya et al., 2003; van Oosterhout et al., 2007; Huang et al., 2011; Matos, 2012; Esteves et al., 2014; Morrow et al., 2014).

Despite all the advances in understanding *P. jirovecii* infection over the last years, in the twenty-first century the standard diagnosis of this disease still depends on the detection of *P. jirovecii* organisms through expensive and laborious technologies (cytochemical or immunofluorescent staining and/or PCR) applied to respiratory specimens obtained by invasive techniques, such as bronchoscopy (Alanio et al., 2016; Matos and Esteves, 2016; Matos et al., 2017; Tomás and Matos, 2018). These standard diagnosis methods, besides being difficult to implement in all economic settings, are not always possible to perform in patients with respiratory failure or in children (Alanio et al., 2016; Matos and Esteves, 2016; Matos et al., 2017; Tomás and Matos, 2018). Therefore, to improve disease management worldwide, there is a need to develop and implement an alternative approach for the diagnosis of PcP that can reduce associated costs, the need for invasive procedures, and also improves response time and specificity.

Lateral flow immunoassays (LFIA) offer an easy solution to these limitations as they are a simple, rapid and user friendly technique, that do not require time-consuming instrumental methods or technical expertise, allowing a low-cost point-of-care alternative (Chan et al., 2013; Pöhlmann et al., 2014; Li et al., 2015; Singh et al., 2015). Although LFIA is a well-recognized technique, a specific serological biomarker for PcP diagnosis has not been established (Morris and Masur, 2011; Esteves et al., 2015; Matos

and Esteves, 2016). Yet, reports of protection against acquisition of infection by passive transfer of immune sera in mice (Gigliotti et al., 2002) and by vaccination in immunosuppressed non-human primates (Kling and Norris, 2016), triggers interest in serum antibodies as serological biomarkers of the disease. In addition, the suggestion that the IgM isotype has a predominant role in shaping the earliest steps in recognition and clearance of *Pneumocystis* infection both in mice (Rapaka et al., 2010) and in humans (Djawa et al., 2010; Tomás et al., 2016), not only support the role of antibodies in disease protection, but also highlights the idea that a serological test for PcP diagnosis is viable.

As *P. jirovecii*'s major surface glycoproteins (Msg) are characteristic of this microorganism and highly immunogenic, containing both B and T cell protective epitopes (Stringer and Keely, 2001), they are the obvious candidate to study serological responses. In fact, promising studies using recombinant antigens of this protein and antibody immunodetection techniques, have shown that patients with PcP or previous episodes of PcP present higher serum levels of anti-*P. jirovecii* antibodies than patients without *P. jirovecii* infection or without previous PcP events (Daly et al., 2004; Djawa et al., 2010; Gingo et al., 2011; Blount et al., 2012; Tomás et al., 2016). However, as Msg presents antigenic variation during infection as an evasion mechanism (Kling and Norris, 2016; Hauser, 2019), other antigenic candidates began to be explored. *Pneumocystis* kexin-like serine protease 1 (Kex1) is one of them, because it holds an antigenically stable active site peptide sequence coded by a nuclear single-copy gene (Kutty and Kovacs, 2003; Esteves et al., 2009), which avoids possible genetic variation. Therefore, recombinant Kex1 antigens were also used to study the humoral response to *P. jirovecii*, and the results suggest that a high humoral response to this protein can be detected and correlates with disease protection (Gingo et al., 2011; Kling and Norris, 2016).

Taking this into consideration and knowing that measuring the presence of biomarkers becomes quicker, more sensitive and more flexible when nanoparticles are put to work as tags or labels (Baptista et al., 2008; Baptista et al., 2011; Almeida et al., 2014), led to the idea to develop an immunonanodiagnostic platform for PcP diagnosis at point-of-care. Gold nanoparticles (AuNPs) are the nanomaterial most commonly used in the development of nanotechnology approaches for clinical diagnosis because of their ability to form conjugates with biomolecules (e.g., proteins and oligonucleotides) and due to their high surface area, stability and intense color (Nagatani et al., 2006; Baptista et al., 2008; Wilson, 2008; Franco and Pereira, 2013; O'Farrell, 2013; Almeida et al., 2014). Thus, in this study, a bionanodiagnostic platform for PcP diagnosis was developed associating recombinant synthetic



antigens of *P. jirovecii*'s Msg and Kex1 with functionalized gold nanoparticles, in order to improve detection of specific anti-*P. jirovecii* antibodies in human sera samples.

This platform, illustrated in **Figure 1**, was developed using AuNP-RSA conjugates to detect IgM anti-*P. jirovecii* antibodies in patients sera, reactive to either of the RSA, in order to allow less invasive biological specimens to be used in the diagnosis of this infectious disease. These LFIA prototypes intends to be specific, sensitive and accurate for PcP diagnosis, making a highly relevant contribution to public health and economy in industrialized countries and in communities with low-income and lack of technology, helping to manage the disease worldwide.

## MATERIALS AND METHODS

### Production of *P. jirovecii*'s Recombinant Synthetic Antigens (RSA) and Anti-RSA Antibodies

#### RSA Production and Expression

The Msg RSA was designed as previously described (Tomás et al., 2016) and Kex1 RSA followed the same procedure, studying the immunogenicity of the *P. jirovecii*'s KEX1 longest gene sequences available (GenBank: AY130996.1 and AY127566.1) (Kutty and Kovacs, 2003). The putative reactive epitopes were selected using bioinformatic tools to analyze electrochemical properties, secondary structure prediction, polarity, relative position to the membrane and hydrophobicity profile of the specific polypeptides at the online software ExPASy – ProtScale and CBS – TMHMM – version 2.0 (Dai et al., 2012, 2013; Tomás et al., 2016). Only specific and conserved regions of *Pneumocystis* KEX1 genes, presenting high similarity with the sequences previously reported in GenBank for *Pneumocystis*' Kex1 protein were considered for the final selection of the RSA composition, through the NCBI blast tool. Regions with high-predicted antigenicity and reactivity were chosen and DNA oligonucleotides coding these regions (connected by pentaglycine residues) were synthesized and cloned into the plasmid pHTP0 (Nzytech®). The insert sequences were confirmed by sequencing (Stabvida®). After synthesis, each RSA was cloned into the expression vector pLATE 31 (#K1261, Thermo Scientific®), following manufacturer's instructions. This process enabled the synthetic production of both RSA with a polyhistidine tail end (6xHis), allowing their purification by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). These vectors were used to clone CaCl<sub>2</sub> competent *E. coli* XJb (DE3) cells by heat shock. Cell pellets from 15 mL of IPTG-induced cultures were re-suspended in 6 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% CHAPS, 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.02 µg.mL<sup>-1</sup> DNase I) and subjected to three cycles of a freeze-thaw method. The supernatants were removed and the pellets were re-suspended in 6 mL of 8 M Urea. An IMAC purification system (HiTrap columns, GE Healthcare®) packed with a histidine chelating resin (Ni Sepharose™ 6 FastFlow, GE Healthcare®) was used. The column was balanced with

10 mL ligation buffer [20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole (pH = 7.4)], then the sample containing the RSA was applied. The column was washed with 10 mL of ligation buffer, and the RSA were eluted with 20 mL of elution buffer [20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 5% (v/v) glycerol (pH = 7.4)]. The eluted proteins were desalted with a desalting membrane (D-0655, Sigma-Aldrich®) into a new buffer [20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaCl, 2% (v/v) glycerol (pH = 7.4)], analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 15% acrylamide gels and by indirect ELISA using anti-polyhistidine antibodies. Their final concentrations were determined (NanoDrop 1000, Thermo Scientific®) before use.

#### Polyclonal Anti-RSA Antibodies Production

In order to produce antibodies able to recognize the RSA produced, ascitic fluids containing polyclonal anti-RSA antibodies were produced following the protocol of Ou et al. (1993), with modifications. Briefly, after RSA purification, 50 µg of each RSA were emulsified in incomplete Freund's adjuvant plus peptide adjuvant and the emulsion was injected intraperitoneally into five 5–6 weeks old BALB/c male mice for each RSA. Subsequent immunizations with 50 µg of RSA emulsified in incomplete Freund's adjuvant, took place at 2–3 weeks interval. After four inoculations, a test-bleed (0.5 mL per animal) was tested by ELISA for titration. When serum titers against the RSA were greater or equal to 1:1000, an intraperitoneal injection of  $1 \times 10^6$  cells of sarcoma 180 cell line was performed in each mouse, to obtain high titer polyclonal ascitic fluids. When a 20–25% increase in body weight of each mouse was recorded (caused by the ascite), they were euthanized and the ascitic fluids were collected and quantified (NanoDrop 1000, Thermo Scientific®). These fluids will be referred throughout this work as “AuNP-RSA antibodies.”

All animals used in the study were housed and cared for under the guidelines set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Good animal handling practices were used and all European Directives were followed, namely the Portuguese DL 113/2013. Experiments were conducted by people certified by the Portuguese national body for experimental animal manipulations “Direção Geral de Alimentação e Veterinária” (DGAV). The facilities at Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa (IHMT/UNL) animal house, procedures for maintenance and care of animals as well the experimental scheme used (immunization, blood collection, spleen removal, and euthanasia procedures) are accredited by the Portuguese DGAV and in accordance with relevant guidelines and regulations of the ethical committee of IHMT/UNL.

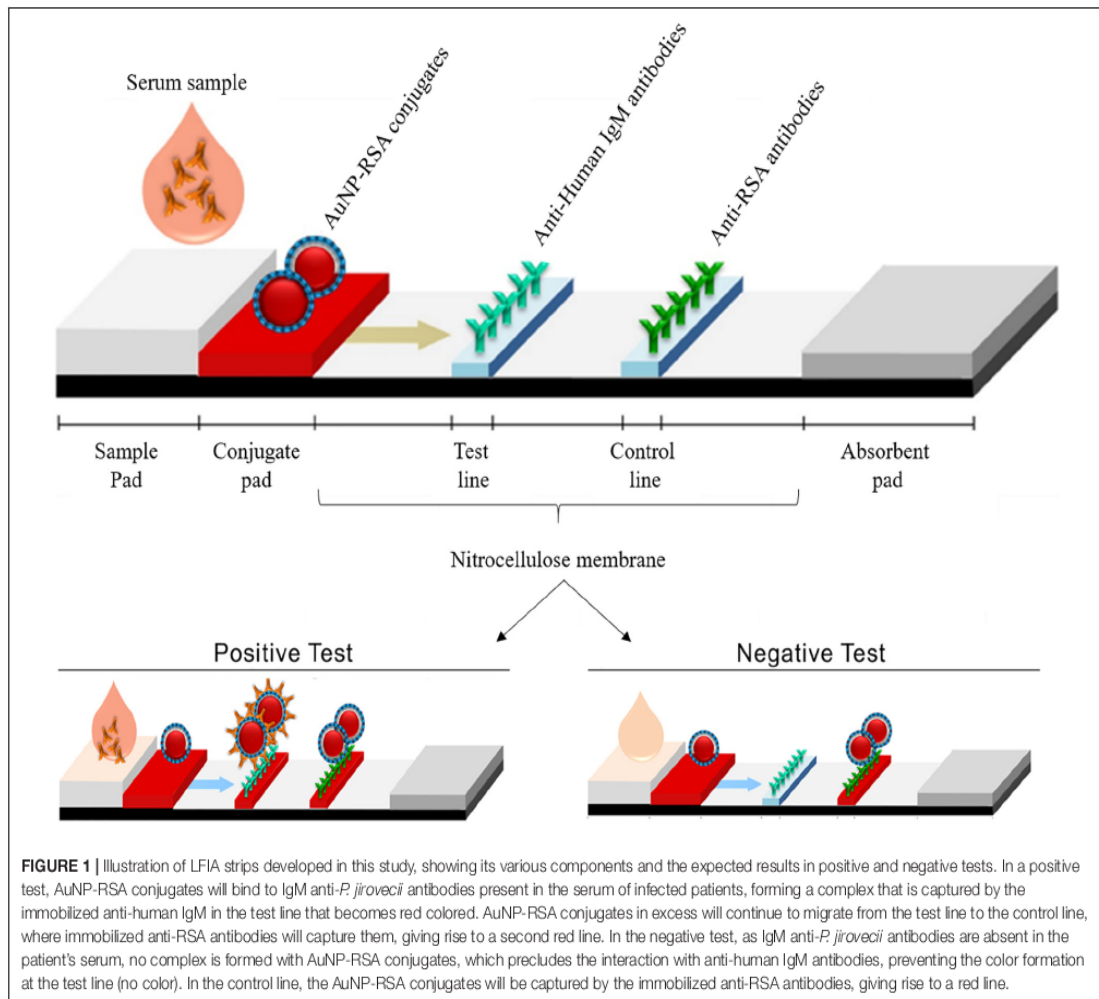
#### Human Serum Specimens

This study retrospectively analyzed sera from 76 HIV-infected patients with respiratory symptoms attending hospitals in the Lisbon area, between 2010 and 2018. Their bronchoalveolar lavage (BAL) specimens were submitted to the Group of Opportunistic Protozoa/HIV and Other Protozoa of Instituto

# Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care

Tomás et al.

Gold-Based Immunodiagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia



de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal) with the purpose of routine diagnosis of PcP with the patients' informed consent and according to the routine institutional procedures. The diagnosis of PcP was confirmed in 48 patients by visualization of the organism in BAL specimens using indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies (IF/MAB) (MONOFLUO *Pneumocystis jirovecii*, BioRad®) and/or by *P. jirovecii*'s DNA detection through nested-PCR (nPCR) from the locus *mtLSUrRNA*, after DNA extraction (QIAamp, QIAGEN®). Twenty-eight patients whose specimens were negative for *P. jirovecii* were considered not infected (without PcP). All patients' demographic data were kept confidential and coded for the research team.

All selected patient's sera samples were analyzed through indirect ELISA for detection of circulation anti-*P. jirovecii* antibodies. Then, the optimization of AuNP-RSA conjugates interaction with anti-*P. jirovecii* antibodies was performed creating a pool of positive sera (positive sample) and a pool of negative sera (negative sample) using five serum specimens from patients with and without *P. jirovecii* infection, respectively.

The Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal) ethics committee approved the study's protocol and waived informed consent as a retrospective observational study.

## ELISA for Detection of Anti-*P. jirovecii*'s Antibodies

The purified RSA were applied individually as antigenic tools in indirect ELISA to detect IgG and IgM anti-*P. jirovecii* in patient's sera. Odd (test) column wells of the microtiter plate were coated overnight at 4°C with 50 µL of the RSA diluted to 5 µg.mL<sup>-1</sup> in 0.05 M carbonate buffer (pH = 8.4). Even (blank) columns wells were coated in the same conditions with PBS 1x. After coating, the wells were washed once with PBS and blocked with 70 µL of 1% polyvinyl alcohol (PVA) for 1 h at room temperature (20–25°C). After blocking, PVA was removed from the plate without washing. Duplicates of each serum sample were analyzed in a test and blank well, under conditions (dilution, incubation time and temperature) determined by the Ig class to be detected and the RSA used as antigenic tool, being the specific protocols presented

at Table 1. Finally, the optical densities (OD) were measured at 405nm and the mean OD of the blank wells was deducted to the mean OD of the test wells to obtain the final OD value for each sample.

Mann-Whitney-U non-parametric tests were used to examine the differences between the distribution of antibody titers in different patient categories with a significance level of 0.05, using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20.0.

## Synthesis and Functionalization of Spherical Gold Nanoparticles

For synthesis and functionalization of gold nanospheres, all glassware was washed with aqua regia and rinsed thoroughly with deionized water followed by ultrapure water ( $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ) before use.

Citrate capped spherical gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized following a method previously described (Bastús et al., 2011). Briefly, 150 mL of a 2.2 mM citrate solution (1.06448, Merck®) was heated using an oil bath, under stirring. After the reflux was established, 1 mL of a 25 mM gold (III) chloride solution (484385, Sigma®) was added to the reaction vessel and let to react for 10 min. After these steps, a seeds suspension was obtained. Then, the resultant suspension was cooled down to  $90^\circ\text{C}$ , keeping the condenser fitted and the stirring conditions. An extra 1 mL of the same gold (III) solution was added and let to react for 30 min. After this period, this last step was repeated.

Later, the citrate capping was replaced by functionalization of the AuNPs with 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA, 450561, Aldrich®). This step involved adding 10 mM 11-MUA ethanolic solution, to attain a 11-MUA:AuNP ratio of 30,000. After an overnight incubation, the AuNPs were washed (3000 g for 30 min) to remove free 11-MUA in solution. The highest volume possible of supernatant was discarded and the pellet was resuspended in ultrapure water up to ~5% of the initial volume. The final suspension was stored in the dark until use.

AuNPs were characterized by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) before and after functionalization and by dynamic light scattering (DLS), electrophoretic light scattering (ELS) and nanoparticle tracking analysis (NTA) after the functionalization process. UV-Vis was performed in a Varian Cary 50 Bio spectrophotometer, using a quartz cell, with the suspension at an appropriate dilution. DLS and ELS measurements were performed three times for the same sample at  $25^\circ\text{C}$ , with light detection at  $273^\circ$  (DLS) and at  $17^\circ$  using the backscatter mode (ELS) of the Malvern Zetasizer NanoZS equipment. NTA was performed in a Malvern Nanosight NS300 (with a 642 nm laser module), with the analysis of 5 videos of 1 min each, captured in 5 different portions of the sample (still mode). These measurements were then merged in a single size distribution.

## Conjugation of AuNPs With the RSA

The antigen concentration to use in the conjugation process to guarantee the maximum coverage of the AuNPs surface but also the colloidal stability of the AuNP-RSA conjugates was optimized. For that purpose, AuNP-Msg and AuNP-Kex1 conjugates were formed through electrostatic interactions

established between increased molar ratios of each RSA and the AuNPs in solution, as described previously (Guirgis et al., 2012; Cavadas et al., 2016; Almeida et al., 2018). A solution of 0.06nM AuNPs was incubated overnight ( $\approx 15 \text{ h}$ ) at  $4^\circ\text{C}$  with molar ratios ranging from 0 to 5000 of Msg and Kex1 stock solutions of 0.16 and  $0.11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. After conjugation, non-bound RSA were removed by centrifugation ( $5800 \text{ g}$  for 5 min), separating the pellets containing the AuNP-RSA from the supernatant, to perform agarose gel electrophoresis (AGE). Agarose gels (0.3%) were prepared by heating agarose in TAE buffer ( $0.125 \times \text{pH} = 8.4$ ), and allowing the gel to form at room temperature. The AuNP-RSA conjugates pelleted after centrifugation were re-suspended in  $13.5 \mu\text{L}$  of phosphate buffer (5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ) and  $1.5 \mu\text{L}$  of glycerol (99%, Nzytech®) prior to loading. The gels were run at constant voltage of 180 V with a 21 cm electrode spacing for 20 min in TAE  $0.125 \times$  using the E865 CONSORT power supply. Digital pictures were acquired (WAS-LX1A Huawei P10 Lite camera) and processed through eReuss software (a gel analysis application freely available at <https://github.com/lkrippahl/eReuss>), providing an accurate measurement of the red bands migration in agarose, which allows the calculation of their electrophoretic mobility (Ferard, 1994; Almeida et al., 2018). Electrophoretic mobility [ $\mu$  ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ )] is defined as the observed rate of migration of a component [ $v$  ( $\mu\text{m}/\text{s}$ )] divided by the electric field strength [ $E$  ( $\text{V}/\text{cm}$ )] in a given medium. In the case of AGE, a solid support medium, only apparent values can be determined (Ferard, 1994). Thus, the molar ratio in which the AuNP-RSA electrophoretic mobility reaches a plateau, corresponding to saturation of the AuNP surface with each RSA, was selected through duplicate experiments.

## Analysis of Human Sera Interaction With AuNP-RSA by Agarose Gel Electrophoresis

To avoid unspecific antibody binding to the AuNP-Msg and AuNP-Kex1 conjugates, bovine serum albumin (BSA) (AppliChem®) and Casein (Sigma®) were studied as blocking agents. A BSA and Casein stock solution at  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  were added to 0.06 nM AuNP-RSA conjugates in solution at increased molar ratios ranging from 0 to 10 with AuNP-Kex1 conjugates and from 0 to 50 with AuNP-Msg conjugates, producing AuNP-RSA-BSA and AuNP-RSA-Casein conjugates. The incubation was performed during 90 min at  $4^\circ\text{C}$ , the non-bound blocking agents were removed by centrifugation ( $5800 \text{ g}$  for 5 min) and the pellets prepared for agarose gel electrophoresis. Similarly to what was done with the AuNP-RSA conjugates, the molar ratio plateau was selected through duplicate experiments for each blocking agent.

An optimal molar ratio of human serum was established in the same way, incubating 0.06 nM solutions of AuNP-RSA-Casein and AuNP-RSA-BSA conjugates with molar ratios ranging from 0 to 7.5 of the positive sera pool ( $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The molar ratio in which the optimal coverage of the conjugate was obtained, was selected.

These serum molar ratios were applied in an AGE assay, where 0.06 nM AuNP-RSA solutions and 0.06nM AuNP-RSA-BSA



# Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care

Tomás et al.

Gold-Based Immunodiagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia

**TABLE 1 |** ELISA protocols and conditions for detection of IgG and IgM anti-*P. jirovecii* antibodies reactive against the RSA produced.

Protocol	RSA applied as antigenic tool			
	Kex1		Msg	
Application of 50 $\mu$ L of serum diluted in PBS with 0.05% tween-20 and 5% BSA	1/20	1/40	1/60	1/140
Incubation		1 h at 37°C		
Washing		4x with PBS with 0.05% tween-20 1x with distilled water		
Application of 50 $\mu$ L of anti-human immunoglobulin M (A2189, sigma <sup>®</sup> ) diluted in PBS with 0.05% tween-20	1/1000		1/4000	
Application of 50 $\mu$ L of anti-human immunoglobulin G (A2064, sigma <sup>®</sup> ) diluted in PBS with 0.05% tween-20		1/3000		1/4000
Incubation		1 h at 37°C		
Washing		4x with PBS with 0.05% tween-20 1x with distilled water		
Application of 50 $\mu$ L of substrate		4-nitrophenylphosphate sodium salt (1 mg.mL <sup>-1</sup> )		
Incubation	Overnight at 4°C	Overnight at 4°C	Overnight at 4°C	2 h at 37°C

and AuNP-RSA-Casein conjugates solutions were incubated for 90 min at 4°C with and without the human positive and negative sera pools. After incubation, the non-bound serum was discarded after centrifugation (5800g for 5 min) and the electrophoretic mobility of each conjugate was established. This assay was performed in triplicate and the analysis of the differences between the electrophoretic mobility of each conjugate formed was evaluated and used to established the optimal conjugate (AuNP-RSA or AuNP-RSA-BSA or AuNP-RSA-Casein) to be used in the LFIA development.

## Assembly of LFIA Strips for Detection of IgM Anti-*P. jirovecii* Antibodies in Human Sera

For LFIA development, a starter kit from Advanced Microdevices, Ambala Cantt, India, was used. This kit offers: two types of cellulose fiber absorbent pads with different thickness (AP-045 with 0.4 mm and AP-080 with 0.8 mm); three types of nitrocellulose membranes (NM) fixed on a plastic backing, with different protein binding capacities (type CNPF, a low protein binding membrane with pore sizes of 8 and 10  $\mu$ m; type CNPC, a high protein binding membrane with pore sizes of 12 and 15  $\mu$ m; and type CNPH, the highest protein binding membrane with wicking times of 70, 90, 150, and 200 s); two glass fiber sample pads, one without any specific pre-treatment (GFB-R4) and a second one pre-treated with buffers and detergents to help prevent non-specific binding of sample components to the pad (GFB-R7L); and two conjugate pads, a polyester matrix without any specific pre-treatment (PT-R5) and another one pre-treated with buffers for uniform movement of gold nanoparticle conjugates (PT-R7).

### Absorbent Pad and Membrane Selection

To perform this selection, dipsticks composed by the nitrocellulose membrane (NM) and the absorbent pad were

tested. Membranes were manually cut into 6  $\times$  0.5 cm sections. The control and test lines were spotted manually, in a circle or in a line, by depositing 0.03 mg.mL<sup>-1</sup> of anti-RSA antibodies (anti-Msg or anti-Kex1, depending on the RSA present in the conjugate) and 0.001 mg.mL<sup>-1</sup> of anti-human IgM antibodies (I-0759, Sigma<sup>®</sup>), respectively. Different dilutions in Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH = 7) for the control antibodies, ranging from 0 to 1/4, and for the test antibodies, ranging from 0 to 1/10, were studied. The membranes dried for 30 min at room temperature before use. A blocking process of the membranes was also tested with an additional step of 30 min incubation at room temperature with skin milk (2%, Sigma<sup>®</sup>), followed by three washes with PBS with 0.05% Tween-20 and dried at 37°C during 30 min. At the top of the membrane, a 3  $\times$  0.5 cm section of absorbent pad (AP-045 or AP-080) was attached with 1–2 mm overlapping with the membrane. A solution of 0.72 nM AuNP-RSA-Casein conjugates was incubated with appropriate molar ratio of positive serum for 90 min at 4°C and then, the dipsticks composed by the NM and the absorbent pad were immersed into 50  $\mu$ L of this solution in a tube, with the absorbent pad side up for 2 min. Driven by capillary forces, the liquid migrated up the membrane into the absorbent pad. The selection of the optimal set of membrane/absorbent pad was based on visually inspection of test and control line results.

### Conjugate Pad, Sample Pad and Sample Buffer and Dilution Selection

To perform this selection, full LFIA strips were assembled and tested. Conjugate release pads available were manually cut into 1  $\times$  0.5 cm sections and tested with and without pre-treatment with PBS containing 5% sucrose, 1% BSA and 0.5% Tween 20. Then, they were saturated with 15  $\mu$ L of conjugate concentrations ranging from 0.2 to 4.6 nM. These conjugate pads dried for 2 h at 37°C before assembling to the membrane/absorbent pad set (see above) and then attached to the bottom of the strip (at

the origin of the sample flow), with 1–2 mm overlapping with the membrane. The sample pads were also manually cut into  $3 \times 0.5$  cm sections and tested with and without prior saturation with 0.03% anti-human immunoglobulin G (2040-04, Sigma®) and dried overnight at room temperature, before assembling at the bottom of the strip, overlapping almost completely with the conjugate pad. After the whole LFIA strip was assembled, 200  $\mu$ L of positive serum diluted from 0 to 1/100 into phosphate buffer (5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH = 7.4), phosphate buffer with 0.05% BSA and 0.05% Tween-20, phosphate buffer with 1% BSA and 1% Tween-20 or PBS with 0.05% Triton-X-100, was added to the sample pad. Driven by capillary force, the sample migrated up the sample pad to the conjugate pad and to the membrane into the absorbent pad. After 10 min, the selection of the optimal set of conjugate pad/sample pad and optimal sample buffer/dilution conditions was based on a visually inspection of test and control line results, on the manufacturer's recommendation for the uniform movement of gold nanoparticles conjugates and on quantification of color intensity in test and control lines.

### Quantification of Color Intensity

The quantification of color intensity in test and control lines was made in strips tested before and after pre-treatment of conjugate/sample pads, in strips tested with different positive sample dilutions and in strips tested with the final optimal conditions. Digital pictures of the optimized strips were acquired (WAS-LX1A Huawei P10 Lite camera) and eReuss (a gel analysis application freely available at <https://github.com/lkrippahl/eReuss>) parameters were adapted for color intensity quantification. To set the image processing, in the band color droplist of the software, the average color of the test and control lines was selected, forcing the software to ignore the color channel in which the lines have a light intensity closer to the background. This step ensures that the intensity value given by the software for each line results from the previous elimination of the background. Then, in the image clipping set, the NM region with both test and control lines results was selected for processing. The software, for each defined vertical strip, sums the color intensity of the pixels in horizontal sections giving a plot with the heights of each point per line. In band profiling step, the conditions in which we intend to measure the peaks of color intensity in the different control/test lines were set. Two Gaussians were fitted per strip, one for each test or control line, with a minimum height value of 5% of the image brightness range, to set the cut-off value of intensity. The remaining parameters were left with the default settings. The software identified the peaks by iteratively fitting a Gaussian distribution to the maximum intensity value in the curve, subtracting that distribution and repeating until either the number of Gaussians was reached or the maximum value falls below the minimum height parameter. A final report with the summarized results was obtained and analyzed for selection of the optimal sample dilution and the need for sample/conjugate pad pre-treatments.

### LFIA Strips Testing With Clinical Samples

The viability of the prepared immunochromatographic strips as tools for detection of anti-*P. jirovecii* antibodies was tested,

in triplicate experiments, by loading human serum pools from patients with and without PcP.

In the case of strips in which the conjugates were composed by AuNP-Msg-Casein, 200  $\mu$ L of positive/negative human serum pools, diluted 1:50 in phosphate buffer with 0.05% BSA and 0.05% Tween-20, were added to the sample pad. In strips with adsorbed AuNP-Kex1-Casein conjugates, 200  $\mu$ L of positive/negative human serum pools, diluted 1:20 in phosphate buffer with 0.05% BSA and 0.05% Tween-20, were used instead. Driven by capillary forces, the samples migrated up the conjugate pad to the membrane into the absorbent pad and, during 10 min, the test results were evaluated visually. Further quantification of color intensity in test and control lines of each strip was performed using the eReuss software.

## RESULTS

### Design, Expression, and Purification of Msg and Kex1 RSA

The Msg RSA was designed as previously described (Tomás et al., 2016).

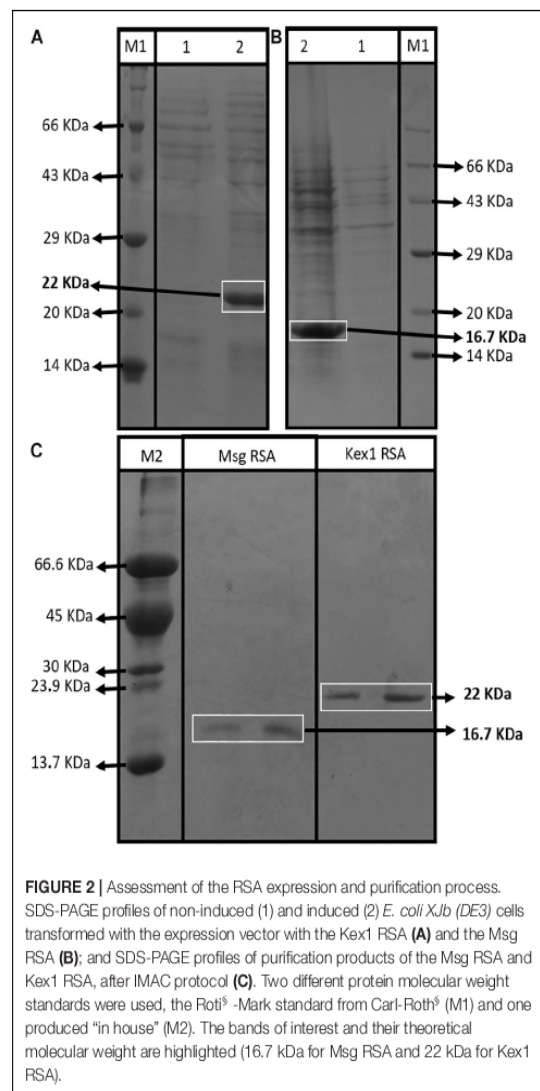
The Kex1 RSA consists of 110 amino acids composed by three regions with high-predicted antigenicity and reactivity from *P. jirovecii*'s Kex1 entire sequence (see **Supplementary Figures S1–S6**), that were chosen and synthesized interconnected by two “linkers” of five glycine residues and expressed with a tail of six residues of histidine. In this RSA, epitope 1 is coded by Kex1<sub>104–134</sub> amino acids, epitope 2 by Kex1<sub>467–501</sub> amino acids and epitope 3 by Kex1<sub>725–758</sub> amino acids, according to GenBank accession numbers AAN12365.1 and AAM97495.1 (see **Supplementary Figure S7**; Kutty and Kovacs, 2003).

The SDS-PAGE analysis showed that both RSA were expressed with their predicted molecular sizes (16.7 kDa for Msg RSA and 22 kDa for Kex1 RSA) after IPTG induction (**Figures 2A,B**) and that they were successfully purified by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) (**Figure 2C**). Indirect ELISA using anti-polyhistidine antibodies were performed to optimize the purification process, ensuring that the RSA were detected during the elution phase and not during column washing after sample application (see **Supplementary Figure S8**).

### Detection of Serum Anti-*P. jirovecii* Antibodies

Two different IgG and IgM ELISA were developed, according to the protocols presented in **Table 1**, using Kex1 RSA and Msg RSA as coating antigens. The results of the distribution of the IgG and IgM anti-*P. jirovecii* levels across patients with PcP and without *P. jirovecii* infection are represented in **Figure 3**.

Both RSA showed applicability in the detection of specific IgG and IgM anti-*P. jirovecii* antibodies. However, IgG ELISA showed inability to distinguish patients with PcP from patients without *P. jirovecii* infection as the median levels of the Igs detected in these patient's groups were not statistically different ( $p > 0.05$ ). Yet, IgM ELISA with both Kex1 RSA and Msg RSA demonstrated ability to distinguish patients with the disease



from patients without *P. jirovecii* infection. With the Kex1 RSA, the median levels of IgM anti-*P. jirovecii* detected by ELISA was 0.3871 in patients with PPC and 0.0997 in patients without *P. jirovecii* infection, which were considered statistically different ( $p < 0.002$ ). With the Msg RSA, the differences between the median levels of IgM anti-*P. jirovecii* detected by ELISA in patients with and without the disease were also considered statistically significant ( $p = 0.001$ ), and the values were 0.6076 in patients with PPC and 0.4195 in patients without *P. jirovecii* infection.

## Characterization of Gold Nanoparticles

Gold nanoparticles were characterized by UV-Vis, DLS, ELS, and NTA.

The UV-Vis spectrum of the citrate-capped AuNPs (as synthesized) shows a localized surface plasmon resonance (LSPR)

band with its maximum at 526 nm. From the UV-Vis spectrum data ( $Abs_{LSPR}$  and  $Abs_{450}$ ), it was determined that the batch of AuNPs had a concentration of 0.2 nM with an average size of 39 nm (Haiss et al., 2007). After functionalization with 11-MUA (see **Supplementary Figure S9A**) the hydrodynamic size data obtained from DLS showed a Z-Average of  $46.2 \pm 0.2$  nm. The zeta-potential value obtained by ELS was  $-36 \pm 1$  mV, indicating a high colloidal stability. The hydrodynamic diameter distribution obtained by NTA (see **Supplementary Figure S9B**), presented an average of  $51.0 \pm 3.8$  nm and a mode of  $41.7 \pm 2.9$  nm. The mode is down shifted by 9.3 nm compared to the average, since the aggregates (especially noticeable in the distribution between 60 and 90 nm) contribute for the mean value.

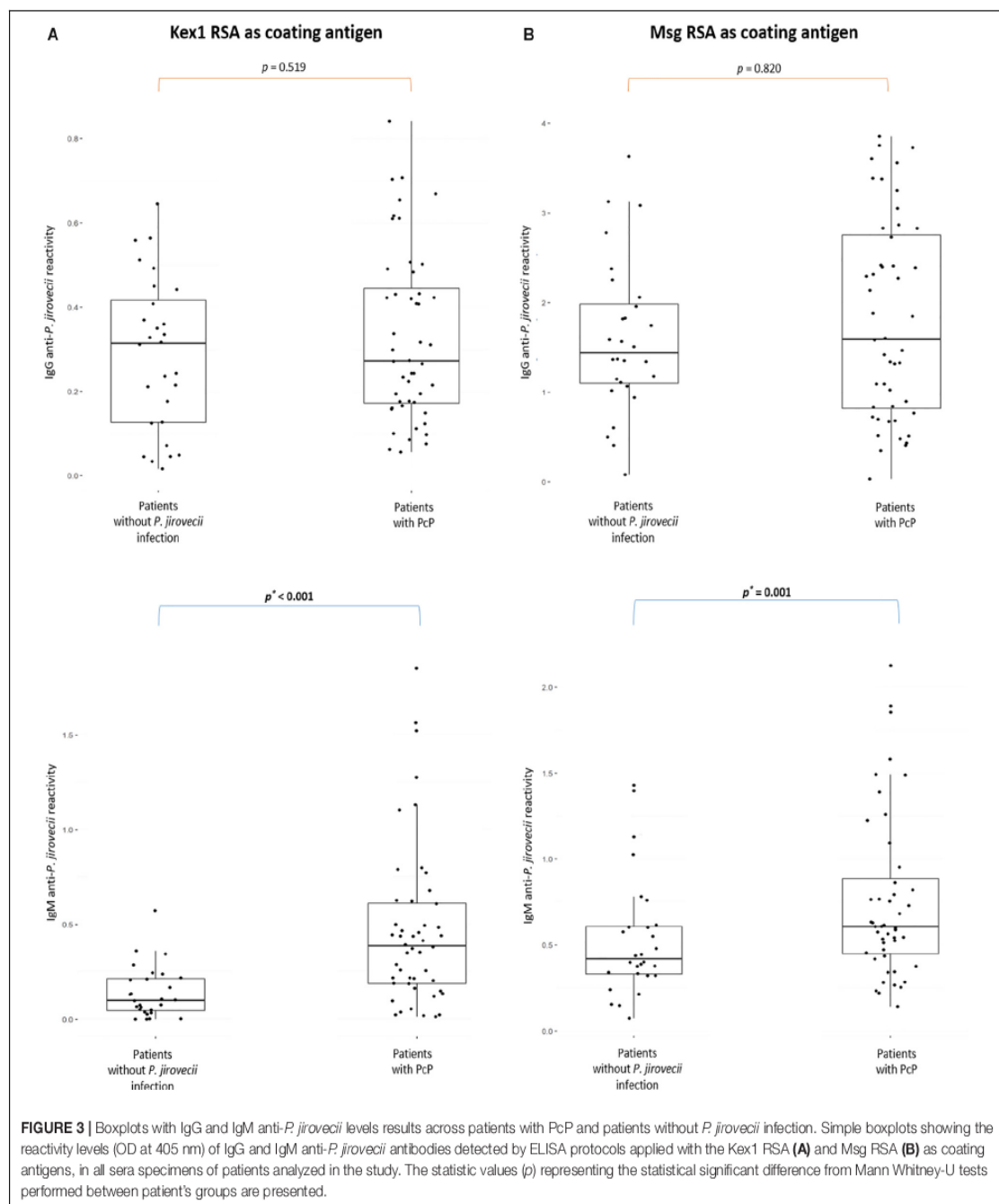
## Gold Nanoparticle-*P. jirovecii*'s RSA Conjugates (AuNP-RSA)

The functionalized AuNPs produced were conjugated to Msg (AuNP-Msg) or Kex1 (AuNP-Kex1) RSA of *P. jirovecii*, in order to synthesize probes for the detection of IgM anti-*P. jirovecii* antibodies in sera of patients with PcP. Agarose gel electrophoresis assays were used to characterize the AuNPs before and after conjugation with the RSA (Guirgis et al., 2012; Cavadas et al., 2016; Kim et al., 2016; Almeida et al., 2018). As shown in **Figures 4A,C**, the migration distance of the RSA-conjugated particles (AuNP-Msg and AuNP-Kex1), compared to the non-conjugated AuNPs, decreases as the RSA:AuNP ratio increases. However, when the amount of RSA reached 175.5 nM (ratio 2925:1), the addition of more RSA no longer decreased significantly the mobility of the conjugates and a plateau began to form. Therefore, a RSA:AuNP ratio of 2925:1 was established as the optimum to produce AuNP-RSA conjugates in which RSA molecules fully cover the AuNPs. For these RSA:AuNP ratios of 2925:1, the difference between the calculated electrophoretic mobility ( $\Delta\mu$ ) of AuNP alone and AuNP-RSA conjugates was  $0.46 \pm 0.01$   $\mu\text{m.cm/V.s}$  for AuNP-Msg conjugates and  $0.42 \pm 0.02$   $\mu\text{m.cm/V.s}$  for AuNP-Kex1 conjugates (**Figures 4B,D**).

## Blocking of AuNP-RSA Conjugates for Reaction With Human Sera

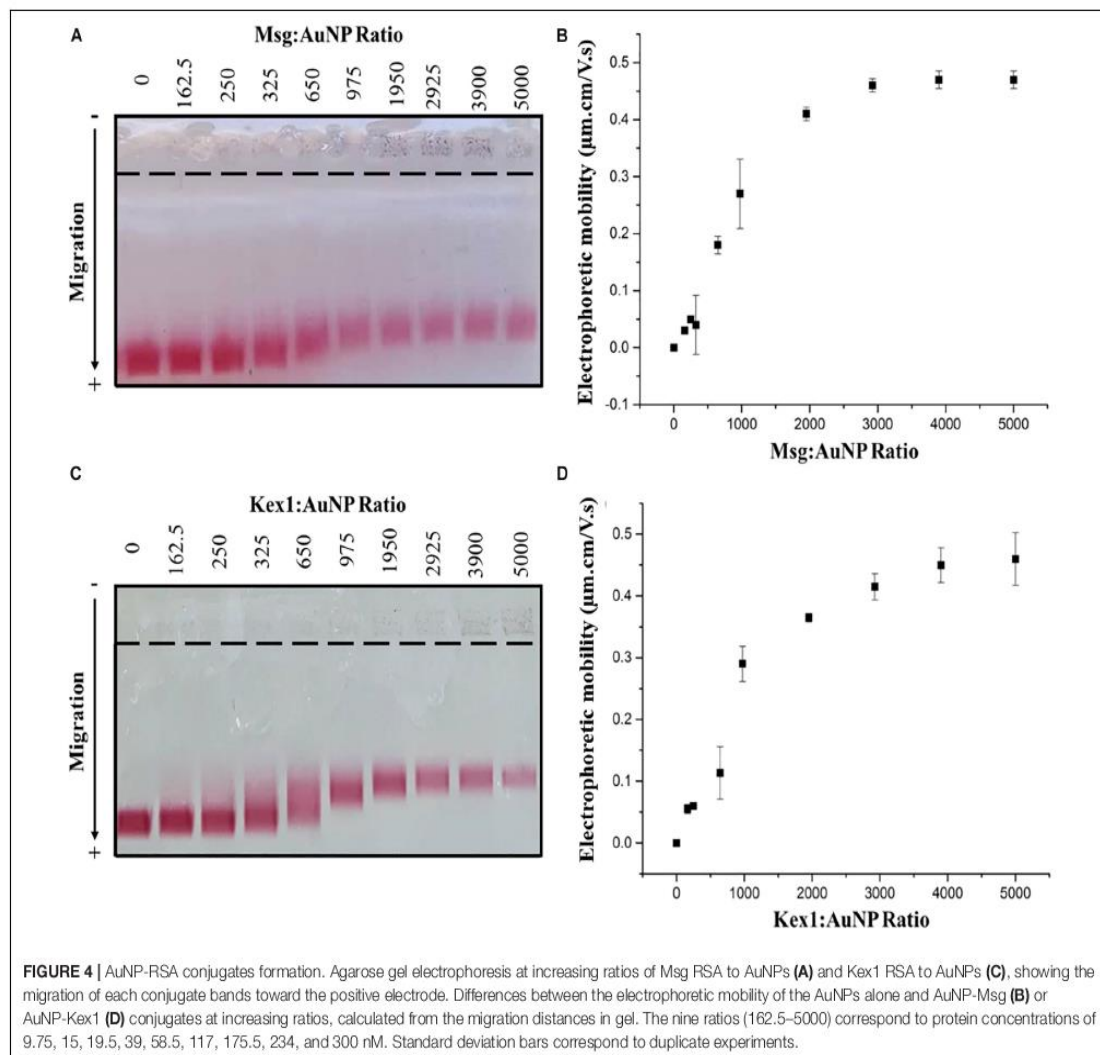
In order to avoid unspecific interactions with human sera, increasing the specificity of the interaction between the conjugates and the target antibodies, blocking of the AuNP-RSA conjugates was assessed with BSA or with casein, two well know proteins used routinely for this purpose in immunoassays (Binder and Isler, 2013). The electrophoretic mobility of AuNP-Msg conjugates incubated with increasing ratios of BSA or casein was determined by AGE (see **Supplementary Figure S10**). A plateau was observed for a BSA:AuNP-Msg ratio of 20, so that value was chosen for future experiments. In the case of AuNP-Kex1 conjugates, since there is no observable interaction of the blocking agents with these conjugates, no particular BSA:AuNP-Kex1 and Casein:AuNP-Kex1 ratios were found (see **Supplementary Figure S11**). However, to evaluate the interaction of human sera with conjugates with and without blocking agent, a ratio of 2:1 of casein to AuNP-Kex1 was used.





The blocked and unblocked AuNP-RSA conjugates were further assessed by AGE to characterize their ability to interact with human sera from patients with and without *P. jirovecii* infection. Based on the same type of AGE experiments, in which several molar ratios of the positive human serum pool to blocked AuNP-RSA conjugates were evaluated, a human serum ratio of 4.55 was selected for further experiments (see **Supplementary Figures S12, S13**).

AuNP-RSA, AuNP-RSA-BSA, and AuNP-RSA-Casein conjugates were incubated with and without positive (PosSerum) and negative (NegSerum) serum pools at the selected ratio and then assessed by AGE (see **Supplementary Figure S14**). Results suggest that there were still free spaces on the surface of the AuNP-Msg conjugates that were blocked by casein and by BSA, causing a decrease in the electrophoretic mobility of the conjugates in the absence



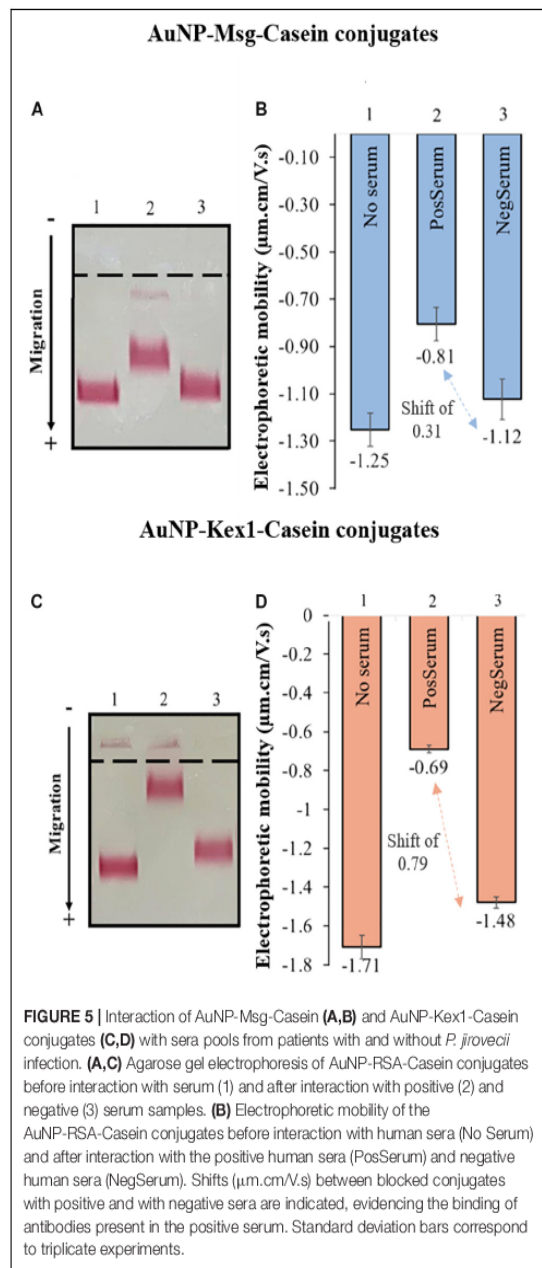
of serum (see **Supplementary Figures S14A,B**). However, in the case of AuNP-Kex1 conjugates (see **Supplementary Figures S14C,D**), the electrophoretic mobility of the conjugates before serum interaction, is very similar in the presence or absence of any blocking agent, which reinforces the idea that the blocking step is not as crucial for these AuNP-Kex1 conjugates as it is for the AuNP-Msg conjugates, as previously observed (see **Supplementary Figures S10, S11**). Nevertheless, the blocking step was maintained for both AuNP-RSA conjugates, in order to avoid the event of non-specific interactions with human sera components. For this purpose, casein appeared to be more effective, as non-specific interactions between the negative serum and the conjugates were lower in the presence of this blocking agent than in the presence of BSA. That can be verified by a decrease in the migration shift between the blocked conjugates, before and after interaction with the negative serum (see **Supplementary Figure S14**: a shift of 0.13  $\mu\text{m.cm/V.s}$  in

AuNP-Msg-Casein conjugates against a shift of 0.42  $\mu\text{m.cm/V.s}$  in AuNP-Msg-BSA conjugates; a shift of 0.23  $\mu\text{m.cm/V.s}$  in AuNP-Kex1-conjugates against a shift of 0.39  $\mu\text{m.cm/V.s}$  in AuNP-Kex1-BSA conjugates).

## Interaction Between Human Sera and AuNP-RSA-Casein Conjugates

The interaction between AuNP-RSA-Casein conjugates and human sera from patients with and without *P. jirovecii* infection was assessed by AGE and is represented in **Figure 5**. Results shows a consistent detection of a migration shift between AuNP-RSA-Casein conjugates that interacted with sera from PcP patients and conjugates that interacted with sera from patients without *P. jirovecii* infection (0.31  $\mu\text{m.cm/V.s}$  in the case of AuNP-Msg-casein conjugates and 0.79  $\mu\text{m.cm/V.s}$  in the case of AuNP-Kex1-casein conjugates). The presence of these shifts in AGE assays are a proof-of-concept for the LFIA to be developed:





**FIGURE 5 |** Interaction of AuNP-Msg-Casein (A,B) and AuNP-Kex1-Casein conjugates (C,D) with sera pools from patients with and without *P. jirovecii* infection. (A,C) Agarose gel electrophoresis of AuNP-RSA-Casein conjugates before interaction with serum (1) and after interaction with positive (2) and negative (3) serum samples. (B) Electrophoretic mobility of the AuNP-RSA-Casein conjugates before interaction with human sera (No Serum) and after interaction with the positive human sera (PosSerum) and negative human sera (NegSerum). Shifts ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ ) between blocked conjugates with positive and with negative sera are indicated, evidencing the binding of antibodies present in the positive serum. Standard deviation bars correspond to triplicate experiments.

in fact, anti-*P. jirovecii* antibodies present in PcP patient's sera specifically interact with both RSA, binding to the AuNP-RSA-Casein conjugates and decreasing their migration distance in the gel. Additionally, no significant interactions between AuNP-RSA-Casein conjugates and non-infected patient's sera occur, since the migration distance of these conjugates before and after contact with the negative sample is similar, considering all the experiments performed.

Results also show that the distance migration shift between conjugates that interact with the positive sera and conjugates

that interact with negative sera is bigger in the presence of AuNP-Kex1 conjugates (up to 2.5x), suggesting that this RSA is a better antigenic tool for anti-*P. jirovecii* antibodies detection than the Msg RSA.

### Assembly and Optimization of LFIA Strips Using AuNP-RSA-Casein Conjugates

For LFIA strips development, a commercial starter kit was used (see section Materials and Methods for a detailed description of the components). LFIA's components selection was based on manufacturer's advices and visual inspection of test and control lines results (data not shown).

#### Absorbent Pad and Membrane Selection and Optimization

By visual inspection, it was observed that all NM can be used successfully without a previous blocking step. Additionally, the signal in the control and test lines appeared to increased proportionally with pore diameter and the wicking time of the NM. However, as membranes type CNPH are presented by the manufacturer as the NM with the highest protein binding capacity, the one with the longest wicking time (200 s) was the one chosen for the LFIA development.

No visual differences were noted in CNPH200 NM dipsticks results using one or the other absorbent pad available in the kit. However, as absorbent pad 045 is thinner, it allows a slower migration along the NM, which may improve the number of interactions in the control and test lines. Therefore, it was the absorbent pad selected for LFIA development.

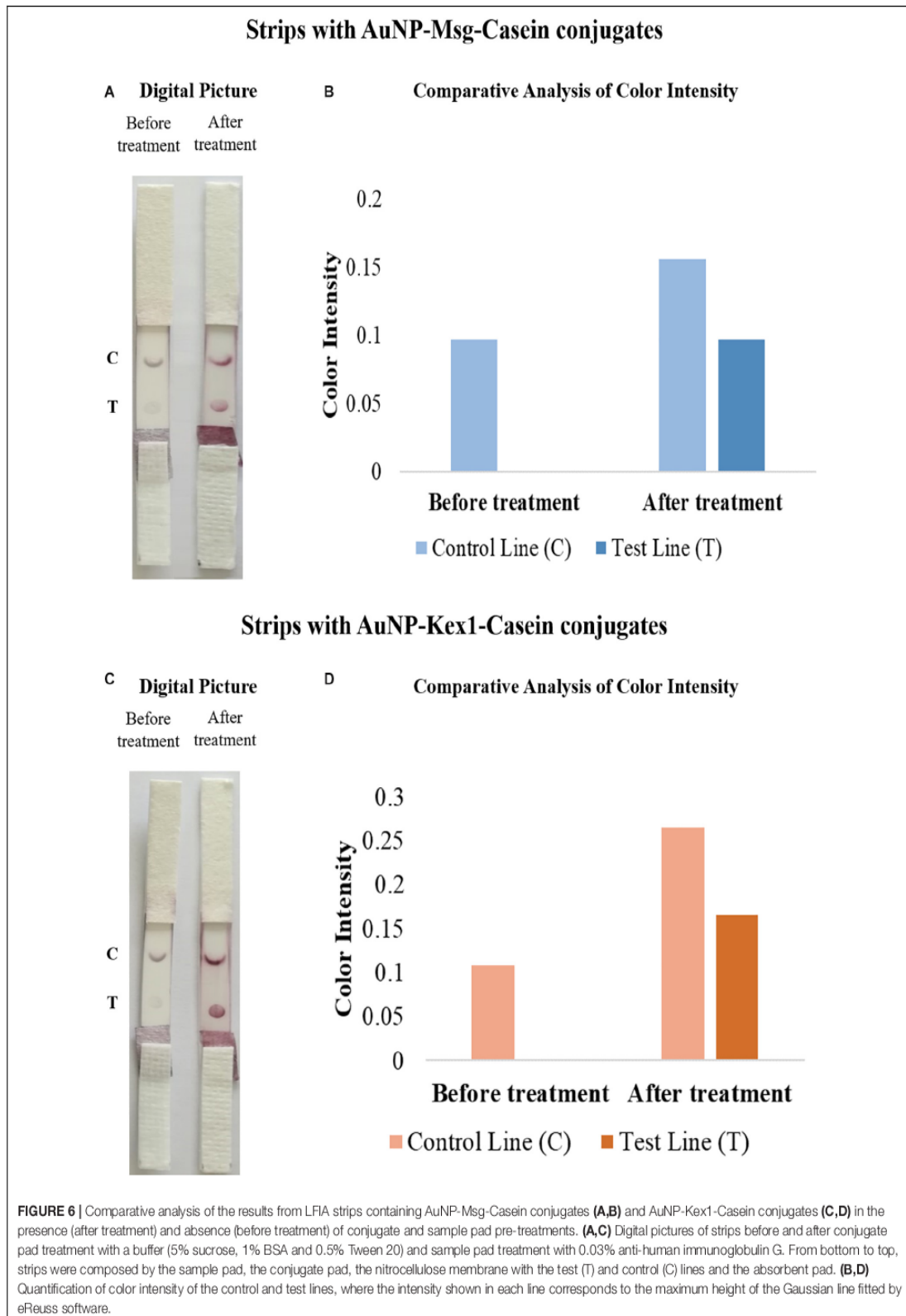
The selection of the control and test antibodies dilutions was made in order to obtain uniform signals in both lines. By visual inspection (data not shown), a dilution of 1/2 in Tris buffer for the control antibodies and no dilution for the test antibodies were selected.

#### Conjugate and Sample Pad Selection and Optimization

In the case of conjugate pads available, as the manufacturer states that the PT-R7 pad was pre-treated for uniform movement of gold nanoparticles conjugates, unlike the PT-R5 pad, the PT-R7 pad was the one selected. Concerning the AuNP-RSA-Casein conjugates concentration to be used, a colloidal solution of 2.4 nM was established as sufficient to provide a visual interpretation of the test results (data not shown).

Regarding the sample pad selection, as GFB-R7L pads were pre-treated by the manufacturer with detergents and buffers that decreased sera non-specific binding to the pad, they allowed better visual interpretation of the results than the GFB-R4 untreated pad, and that's why GFB-R7L pad was the one chosen.

To improve signal intensity on both test and control lines, pre-treatments of the selected conjugate pad (with a buffer containing sucrose, BSA and Tween 20) and sample pad (with anti-human immunoglobulin G) were performed. The color intensity of test/control lines in strips before and after treatment was assessed visually and quantified by the eReuss software, and the results are presented in Figure 6. Results show that pre-treatments



steps enhanced visual signal of both test and control lines (Figures 6A,C), which was confirmed by color quantification, showing higher peaks of color intensity in both lines after these treatments (Figures 6B,D).

### Sample Buffer and Dilution Selection

By visual inspection of strip results (data not shown), phosphate buffer with 0.05% BSA and 0.05% Tween-20 was selected as the optimal sample buffer. Then, final dilutions of 1:50 and 1:20 of sera samples were established as optimal for LFIA with AuNP-Msg-Casein conjugates and AuNP-Kex1-Casein conjugates, respectively, through visual inspection and color intensity quantification of strip test results, represented in Figure 7. Although higher color intensities were expected at lower sample dilutions, these results were reproducible and may be associated with an agglutination phenomenon, further addressed in the Discussion section.

### Optimized LFIA Strips Testing With Human Sera Pools

After optimization, LFIA strips were tested with sera pools from patients with (positive sample) and without (negative sample) PcP, in triplicate experiments (see Supplementary Figure S15). Visually, 3 min after sample addition it was already possible to detect the presence of a colored line in the control zone on strips with the negative sample and two colored lines, in the control and test zones, on strips with the positive sample. The results remained invariable 10 min after the end of the elution process, i.e., solvent reaching the absorbent pad (Figures 8A,C).

The software used for color intensity analysis was unable to detect color on the test lines of the strips with negative samples, and detect similar color intensity for the control and test lines on the strips with positive samples (Figures 8B,D).

## DISCUSSION

Nowadays, there is a demand to find point-of-care diagnostic tests that enable fast and inexpensive screening/diagnosis of infectious diseases, to improve disease control and retrenchment of healthcare systems costs worldwide. In the case of *Pneumocystis* pneumonia, in which there are no specific clinical, radiologic or gasometric findings and none of the serologic biomarkers studied until now showed to be highly-specific of the disease (Morris and Masur, 2011; Esteves et al., 2015; Matos and Esteves, 2016; Tomás and Matos, 2018), this has been a challenge. Thus, current diagnosis techniques depend on the direct or indirect detection of the pathogen in respiratory specimens, which makes them dependent on costly and invasive procedures.

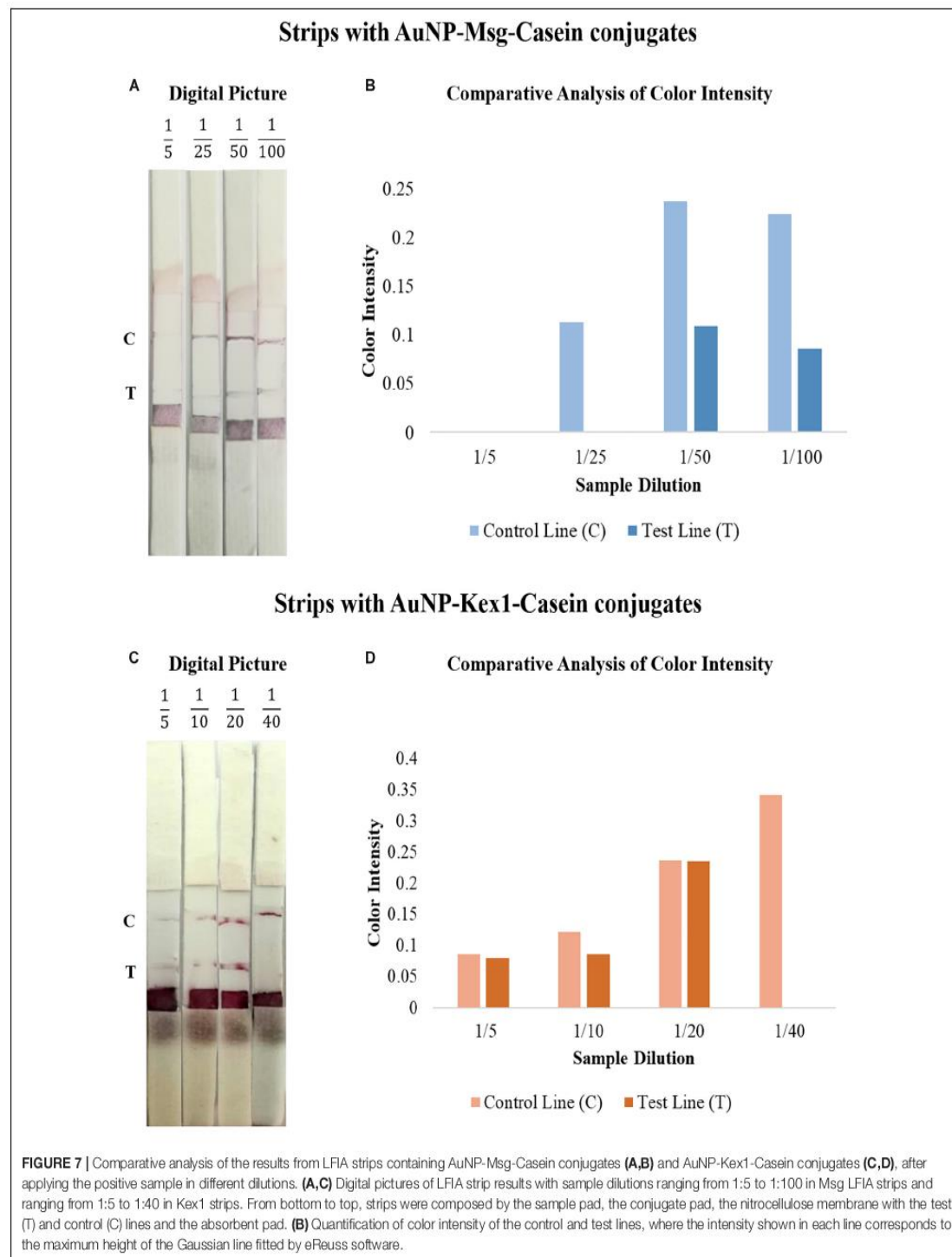
Recently, studies showed that a technology based on synthetic amino acid sequences, designed to hold more than one reactive region of the selected antigens, could enhance the immunological diagnosis of *Toxoplasma gondii* (Dai et al., 2012, 2013). Therefore, in our previous study, this research group designed a recombinant synthetic antigen (RSA) with three antigenic regions of the Msg protein, in order to standardize and enhance

the detection of reactive antibodies against *P. jirovecii* (Tomás et al., 2016). In this single antigenic tool, several proven reactive and conserved fragments of the Msg were used, improving its immunogenic power and consequently its application as an anti-*P. jirovecii* antibody detection tool (Tomás et al., 2016). In the present study, this RSA was used in combination with a new RSA, produced based on the immunogenic behavior of *P. jirovecii* Kex1 protein. This second RSA was also designed to hold more than one reactive region of *P. jirovecii* Kex1 protein, in order to increase the sensitivity and specificity of the serological approach. The idea of using this new protein (Kex1), encoded by a single copy gene (Kutty and Kovacs, 2003), emanate from the recent reports that support its role in the protection of PcP (Gingo et al., 2011; Kling and Norris, 2016) and to counteract the genetic variation that the Msg protein may present during infection (Hauser, 2019).

Both RSA were obtained with high purity (Figure 2C), and were applied as antigenic tools in different ELISA assays (Table 1) to assess whether specific anti-*P. jirovecii* antibodies can be detected in human sera at the time of patient's presentation with symptomatology compatible with PcP. Thus, 76 serum specimens collected at the time of patient's BAL procedure for PcP routine diagnosis were analyzed by these optimized indirect ELISA with both RSA, for detection of IgG and IgM anti-*P. jirovecii* antibodies. IgG ELISA results showed that, even though IgG response is detected with both RSA, it is not possible to distinguish patients with PcP from patients without *P. jirovecii* infection by their IgG levels (Figure 3). That may be explained by previous PcP events or by the reports of *P. jirovecii* colonization in patients presenting diverse levels of immunodeficiency, primary respiratory disorders, or even in the immunocompetent general population (Wakefield et al., 2003; Medrano et al., 2005; Morris and Norris, 2012), which could lead to the production of memory cells that could induce IgG antibodies production throughout the individual's life.

Yet, IgM ELISA using each RSA as a coating antigen (Figure 3), showed successful application in the serodiagnosis of PcP, as anti-*P. jirovecii* levels detected, unlike IgG levels, were significantly different between patients with and without the disease ( $p \leq 0.001$ ). These results corroborate what had previously been verified in studies with mice, where it was suggested that the IgM isotype has a predominant role in shaping the earliest steps in recognition and clearance of *P. jirovecii* infection, since IgM-deficient mice showed to be more susceptible to PcP progression (Rapaka et al., 2010). These results suggest that IgM anti-*P. jirovecii* antibodies seems to be a possible serological biomarker for active PcP diagnosis, which could provide a major improvement over the current diagnosis standards.

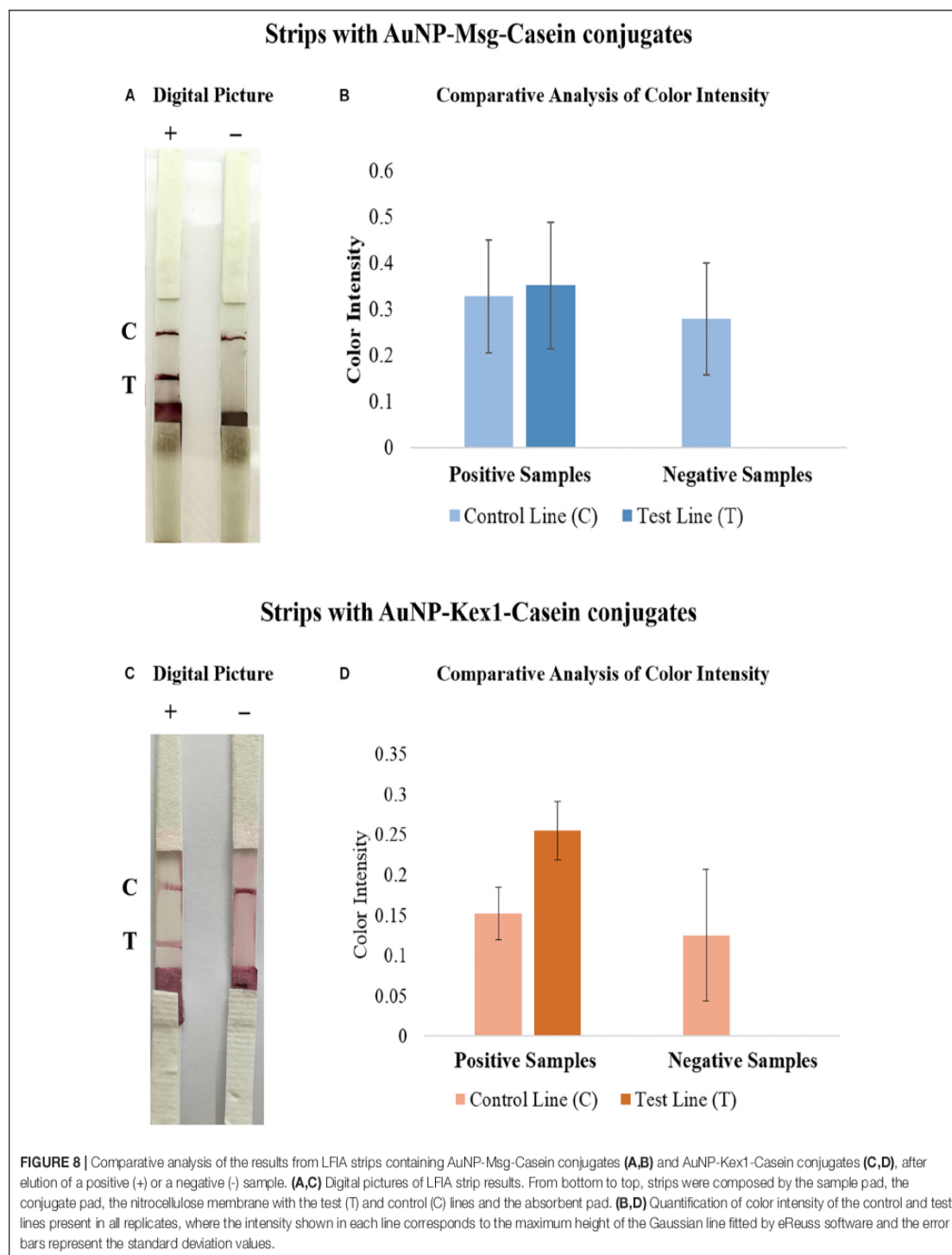
Taking this into consideration, the innovative character of the present study stems from the use of these RSA in association with gold nanoparticles with tunable bright colors, to design a point-of-care platform for PcP diagnosis based on a solid-phase (strip-based) test. The LFIA developed relies on the ability of AuNPs to interact with the RSA to form conjugates that are used as recognition tools capable of interacting with IgM anti-*P. jirovecii* antibodies present in the serum of patients with PcP



(Figure 1). Although the traditional LFIA schemes for antibody detection uses AuNPs conjugated with an immunoglobulin-binding protein and the pathogen's antigen immobilized in the analytical zone (test line), some studies have shown that a

less conventional scheme using AuNPs directly conjugated with pathogen's antigen molecules for detection of serum antibodies can achieve greater diagnostic sensitivity (Sotnikov et al., 2015, 2018). This increase in sensitivity is achieved by targeting the





capture of the antibodies of interest in the conjugation process, due to the specific interaction of those antibodies with the corresponding antigens present in the conjugates. Thus, as in this study we sought to detect IgM, a class of immunoglobulins

whose serum levels remain elevated for a short period of time during infection, less conventional AuNP-antigen conjugates were chosen for LFA development. Additionally, ELISA results have shown that both Msg and Kex1 RSA are able to interact

# Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care

Tomás et al.

Gold-Based Immunodiagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia

specifically with anti-*P. jirovecii* IgM antibodies in patient's sera samples. Then, two LFIA strips for the detection of anti-*P. jirovecii* antibodies in human sera were developed, based on AuNP-Msg and AuNP-Kex1 conjugates.

Lateral flow technology is well suited to point-of-care diagnostics because it is robust and inexpensive, not requiring power, a cold chain for storage and transport, or specialized reagents (O'Farrel, 2013). This is possible because all necessary materials and reagents are prepared to be stable and ready to use at the time of sample application and the use of AuNPs ensures a visual interpretation of the results, without the need for any detection instrument.

Therefore, in this study, we synthesized MUA-capped AuNPs with a large diameter ( $\approx 40$  nm, see **Supplementary Figure S9**) to obtain higher color intensity in the test/control lines with lower AuNPs concentrations (Haiss et al., 2007; Santra et al., 2017), which also helps to guarantee the low cost of the test. Additionally, the 11-MUA ligand is known to favor electrostatic protein conjugation with AuNPs (Gomes et al., 2012), which helped AuNPs conjugation with the *P. jirovecii*'s RSA and the formation of AuNP-Msg and AuNP-Kex1 conjugates.

These AuNP-RSA conjugates were characterized and optimized through AGE assays which allow the separation of the conjugates according to their differences in size and surface charge (Guirgis et al., 2012; Franco and Pereira, 2013; Cavadas et al., 2016; Kim et al., 2016; Almeida et al., 2018). Analysis of AuNP-RSA conjugates with increasing RSA:AuNP molar ratios after electrophoresis (**Figures 4A,C**) showed that as more RSA is adsorbed at the AuNPs surface, the formed conjugate migrates less in the agarose gel. This is consistent with increases in size, which decreases their electrophoretic mobility, and decreases in negative charge due to shielding induced by RSA coverage of the AuNPs, decreasing their ability to migrate toward the positive electrode. It was possible to define a plateau for the mobility of the AuNP-RSA conjugates (**Figures 4B,D**), considering the standard deviation values, that corresponds to saturation of the AuNPs surface with the RSA. So, these assays confirmed the formation of a persistent RSA corona around the AuNPs and allowed the selection of an optimal molar ratio of ca. 3000 RSA per AuNP for coverage of AuNPs with both RSA.

The ability of AuNP-RSA conjugates to interact with specific anti-*P. jirovecii* antibodies from human sera was also evaluated by AGE. The purpose of these assays was to establish a proof-of-concept for the LFIA test, demonstrating that these conjugates are indeed capable of functioning as anti-*P. jirovecii* antibody recognition tools. To achieve this goal, AuNP-RSA conjugates were incubated with human serum before and after treatment with BSA and casein (see **Supplementary Figure S14**), which are two non-antibody-reactive blocking agents that are usually applied as immunoassay blockers (Binder and Isler, 2013). This step was performed to ensure blockage of non-specific binding sites available on the surface of AuNPs after saturation with the RSA, so that non-specific interactions between AuNPs and serum proteins were minimized. For both AuNP-RSA conjugates, casein proved to be the most effective blocking agent, reducing non-specific interactions between human sera and those conjugates (see **Supplementary Figure S14**). However, even in the presence

of a pre-blocking step with casein, there is some residual interaction between the negative serum and the conjugates (**Figure 5**). This event can be due to the presence of IgG anti-*P. jirovecii* antibodies in sera of patients with previous contact with *P. jirovecii*, which is supported by reports of high seropositivity for *P. jirovecii* in healthy individuals (Morris and Norris, 2012). Yet, the presence of these type of interactions does not impair the LFIA concept to be developed for two main reasons. The first one is based on the fact that these interactions will not be detected in the LFIA strip test because the search is directed to the presence of IgM anti-*P. jirovecii* antibodies, as this Ig class was the only one showing applicability in distinction of patients with active disease from not infected patients, with the ELISA results. The second reason is the consistent presence of a migration shift in the AGE assay resulting from different electrophoretic mobility's of AuNP-RSA-Casein conjugates after interaction with the positive and negative samples (**Figure 5**). These shifts result from specific interactions between anti-*P. jirovecii* antibodies present in the sera of PcP patients and the RSA, which leads to a decrease in the migration of the AuNP-RSA-Casein conjugates after contact with the positive sample, functioning as a proof-of-concept for the LFIA to be developed. It's important to notice that a more significant shift was achieved when using the Kex1 RSA. Although this was theoretically unexpected, since Kex1, unlike Msg, is not a specific or multicopy *P. jirovecii* surface antigen, it was consistent with our ELISA results that showed more significant differences between PcP and no PcP patient's IgM levels with the Kex1 RSA than with the Msg RSA. Together, these results suggest that this antigen will provide better diagnostic performance to the LFIA test than the Msg RSA.

Even so, the next step was the assembly of the two LFIA strips for detection of IgM anti-*P. jirovecii* antibodies in human sera. For that, components from a commercial starter kit were tested. Based on the visual interpretation of the strip results and on the manufacturer's recommendations for the development of LFIA with AuNP conjugates, the final components were selected. Then, the LFIA results were optimized to meet the following criteria: the appearance of color in the test and control lines within a reasonably short time (up to 10 min); presentation of a positive and negative result easily distinguished by the naked eye and confirmed by color quantification; minimum consumption of reagents for cost control. Taking this into consideration, pre-treatment steps were performed in the selected conjugate and sample pads. During the optimization process, it was noted that after adsorption, it was difficult to elute the AuNP-RSA-Casein conjugates from the conjugate pad (data not shown). Thus, as previously described by other authors that developed colloidal gold-based lateral-flow immunoassays (Kolosova et al., 2007; Li et al., 2015), we pre-treated the conjugate pad with a buffer containing 5% sucrose, 1% BSA and 0.5% Tween 20, to improve conjugates stability and re-solubilization. On the other hand, since the LFIA assay is only intended for the detection of IgM class antibodies and since AGE assays have shown that other immunoglobulins (probably IgG) can interact with our conjugates, we considered adding a preliminary

step to eliminate some of the patient's IgG antibodies before serum contact with the conjugates. For this purpose, a pre-treatment of the sample pad with anti-human IgG antibodies was made, as suggested by other authors which developed LFIA for detection of IgM antibodies (Li et al., 2015). The aim of this step was to increase the sensitivity of the test by decreasing the percentage of anti-*P. jirovecii* IgG antibodies that reach the conjugate pad, in order for the conjugates to be more available to interact with the target IgM anti-*P. jirovecii* antibodies.

The results from **Figures 6A,C** show that visually the test and control lines became easier to see with the naked eye and the results from **Figures 6B,D** confirmed this by color quantification. The comparative analysis of color intensity between strips before and after treatment, showed that the color intensity of both control and test lines has increased after treatment and that the software was not able to recognize the visible signal on the test line before treatment with the cut-off established. These results confirm that the pre-treatment steps improve the interpretation of the results, demonstrating that these steps are crucial to increase the assay sensitivity. On the other hand, the results showed a more intense color in the control line than in the test line. However, as the signal in the control line is suffering from drying effect ("coffee-ring"), we decided to make the following optimizations dispensing the control and test antibodies in a line instead of in a circle.

After, the sample dilution was also optimized (**Figure 7**). The intensity of the signals in the control and test lines increased with the dilution of the sample up to 1:50 in LFIA with the AuNP-Msg conjugates and up to 1:20 in LFIA with the AuNP-Kex1 conjugates. Although signal weakening at higher dilutions was expected due to excessive sample dilution, the lack of test signals or the presence of a weaker signal at low dilutions, with both AuNP-RSA-Casein conjugates, was not expected. This is especially relevant for AuNP-Msg-Casein conjugates. We speculate that excessive levels of anti-*P. jirovecii* antibodies in the samples might lead to the formation of conjugate-antibody aggregates, preventing their free movement along the elution profile. The need for higher dilutions for conjugates with the Msg RSA than for conjugates with the Kex1 RSA was anticipated and consistent with our ELISA results, which demonstrated that serum levels of anti-Msg antibodies are higher than serum levels of anti-Kex1 antibodies. Taken together, these results demonstrate that sample dilution and sample pad pre-treatment are key factors that influence LFIA performance, and should be reevaluated when validating these LFIA in a large cohort study, before their implementation in the clinical practice.

Finally, triplicates of the optimized LFIA strips (see **Supplementary Figure S15**) were tested with a pool of serum specimens from patients with PcP (positive sample) and a pool of serum specimens from patients without *P. jirovecii* infection (negative sample) in the selected dilutions (**Figure 8**). During these assays, it was established that 3 min are enough for the sample to elute completely until the absorbing pad, giving a LFIA final result. The digital pictures (**Figures 8A,C**) and the color intensity analysis (**Figures 8B,D**) of the final

results showed that in strips tested with the negative pool, only a colored line was visible on the control zone and detected by the color quantification software in all replicates. Additionally, in strips tested with the positive sample, a colored line was visible and detected by the software in both test and control zones as expected in all replicates, in both Msg and Kex1 LFIA strips.

However, these results also show that further optimization processes are needed. On the one hand, the variability between the assays (represented by the error bars in **Figure 8**), which may be justified by the lack of standardization of reagent application and strips assembly, should be minimized through automatic manufacturing processes. On the other hand, the results show that the color intensity in the control line is higher in strips tested with negative samples than in strips tested with positive samples. Although this could be explained by a higher number of free AuNP-RSA-Casein conjugates in strips tested with negative samples, it should be addressed in further optimizations by improving the conjugates:control antibodies ratio used. Finally, the results from Msg LFIA strips, showed that the conjugates seem to have formed aggregates. Although this did not impair the performance of the test, future optimization should focus on maintaining the stability of these conjugates after adsorption to the conjugate matrix, in order to obtain equally intense red lines in the LFIA strips.

## CONCLUSION

In conclusion, this study provides a proof-of-concept that a point of care diagnostic test for PcP can be developed and that both LFIA developed allow the detection of IgM anti-*P. jirovecii* reactive against both RSA. This is important because in our previous study (Tomás et al., 2016) and in this study, we verified that IgM levels could be used as a serological biomarker of *P. jirovecii* active infection. However, future work is needed in order to optimize and validate this diagnostic approach in a large prospective study with patients from different clinical groups, in order to assess the sensitivity, specificity and accuracy of the two LFIA strips proposed, individually and combined. Only with these results, it will be possible to confirm the need to study the reactivity against more than one RSA in parallel and then optimize a diagnostic kit, for implementation in the clinical practice. If both AuNP-RSA conjugates prove useful in PcP diagnosis, a multiplex strategy, based in the use of two conjugate pads for the simultaneous detection of two proteins (Zhu et al., 2013), could be adapted for the present LFIA strips.

The technology proposed in this study reveals to the scientific community how these less conventional conjugates can be used in the development of an alternative approach to the conventional diagnosis of PcP, reducing the need for the current invasive procedures used in the collection of respiratory specimens, as well as reducing time response and costs associated with PcP diagnosis. Ultimately, this study will help in the management of PcP in industrialized countries, also having a major impact on



# Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care

Tomás et al.

Gold-Based Immunodiagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia

developing countries with low income and lack of technology, where PcP is an emerging disease with high prevalence and poorly controlled.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements. The animal study was reviewed and approved by the Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisbon, Portugal.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AT, RF, and OM were responsible for the study design. AT wrote the manuscript. AT, MA, FC, and MP performed the experiments. OM, EP, and RF were responsible for reagents, materials, and analysis tools supplies. All authors contributed to the approval of the final version of the manuscript.

## REFERENCES

- Alanio, A., Hauser, P. M., Lagrou, K., Melchers, W. J., Helweg-Larsen, J., Matos, O., et al. (2016). ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2386–2396. doi: 10.1093/jac/dkw156
- Almeida, M. P., Pereira, E., Baptista, P. V., Gomes, I., Figueiredo, S., Soares, L., et al. (2014). "Gold nanoparticles in analytical chemistry," in *Comprehensive Analytical Chemistry*, 1st Edn, eds M. Valcárcel, and A. I. López-Lorente (Amsterdam: Elsevier), 529–567.
- Almeida, M. P., Quaresma, P., Sousa, S., Couto, C., Gomes, I., Krippahl, L., et al. (2018). Measurement of adsorption constants of laccase on gold nanoparticles to evaluate the enhancement in enzyme activity of adsorbed laccase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 16761–16769. doi: 10.1039/C8CP03116A
- Baptista, P. V., Doria, G., Quaresma, P., Cavadas, M., Neves, C. S., Gomes, I., et al. (2011). Nanoparticles in molecular diagnostics. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 104, 427–488. doi: 10.1016/B978-0-12-416020-0.00011-5
- Baptista, P. V., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., et al. (2008). Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 943–950.
- Barry, S. M., and Johnson, M. A. (2001). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. *HIV Med.* 2, 123–132.
- Bastús, N. G., Comenge, J., and Puentes, V. (2011). Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir* 27, 11098–11105. doi: 10.1021/la201938u
- Binder, S., and Isler, J. A. (2013). "Detection of antibodies relevant to infectious disease" in *The Immunoassay Handbook*, ed. D. Wild (Oxford: Elsevier), 149–155.

## FUNDING

This work was supported by grants from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (MCTES funds, Portugal) and European Union (European Social Fund and European Regional Development Fund): UID/Multi/04378/2019 and POCI-01-0145-FEDER-007728 (UCIBIO-REQUIMTE); UID/QUI/50006/2019 and POCI-01-0145-FEDER-007265 (LAQV-REQUIMTE); UID/Multi/04413/2013 (GHTM); SFRH/BD/95983/2013 (to MA); and SFRH/BD/108433/2015 (to AT). Partially funded by a Gilead GÉNESE grant (PGG/001/2014). The authors declare that funding sources had no role in the study design, data collection, data interpretation or, writing of the report.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Prof. Ludwig Krippahl (NOVA LINC, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Portugal), for developing the gel analysis application eReuss, and to Carlos Costa for the help with the eReuss software application in quantitative analyzes.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02917/full#supplementary-material>

- Blount, R. J., Jarlsberg, L. G., Daly, K. R., Worodria, W., Davis, J. L., Cattamanchi, A., et al. (2012). Serologic responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein among Uganda patients with respiratory symptoms. *PLoS One* 7:e51545. doi: 10.1371/journal.pone.0051545
- Cavadas, M. A. S., Monopoli, M. P., Cunha, C. S. E., Prudêncio, M., Pereira, E., Lynch, I., et al. (2016). Unravelling malaria antigen binding to antibody-gold nanoparticle conjugates. *Part. Part. Syst. Charact.* 33, 906–915. doi: 10.1002/ppsc.201600187
- Chakaya, J. M., Bii, C., Amukoye, E., Ouko, T., Muita, L., Gathua, S., et al. (2003). *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV/AIDS patients at an urban district hospital in Kenya. *East Afr. Med. J.* 80, 30–35.
- Chan, C. P., Mak, W. C., Cheung, K. Y., Sin, K. K., Yu, C. M., Rainer, T. H., et al. (2013). Evidence-based point-of-care diagnostics: current status and emerging technologies. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 6, 191–211. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092641
- Dai, J., Jiang, M., Wang, Y., Qu, L., Gong, R., and Si, J. (2012). Evaluation of a recombinant multi-epitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 338–342. doi: 10.1128/CVI.05553-11
- Dai, J. F., Jiang, M., Qu, L. L., Sun, L., Wang, Y. Y., Gong, L. L., et al. (2013). *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant multi-epitope peptide for distinguishing recent from past infection in human sera. *Exp. Parasitol.* 133, 95–100. doi: 10.1016/j.exppara.2012.10.016
- Daly, K. R., Koch, J., Levin, L., and Walzer, P. D. (2004). Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2004, 848–854. doi: 10.3201/eid1005.030497
- Djave, K., Huang, L., Daly, K. R., Levin, L., Koch, J., Schwartzman, A., et al. (2010). Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein



- in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. *PLoS One* 5:e14259. doi: 10.1371/journal.pone.0014259
- Esteves, F., Calé, S. S., Badura, R., De Boer, M. G., Maltez, F., Calderon, E. J., et al. (2015). Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers. *Clin. Microbiol. Infect.* 21:379.e1–e10. doi: 10.1016/j.cmi.2014.11.025
- Esteves, F., Medrano, F. J., de Armas, Y., Wissmann, G., Calderón, E. J., and Matos, O. (2014). *Pneumocystis* and *Pneumocystosis*: first meeting of experts from Latin-American and Portuguese-speaking countries - a minireview. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12, 545–548. doi: 10.1586/14787210.2014.894883
- Esteves, F., Tavares, A., Costa, M. C., Gaspar, J., Antunes, F., and Matos, O. (2009). Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of *Pneumocystis jirovecii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 175–178. doi: 10.1007/s10096-008-0596-1
- European Centre for Disease Prevention, and Control (ECDC)/WHO Regional Office for Europe, (2018). *HIV/AIDS Surveillance in Europe 2018 - (2017) Data*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.
- Ferard, G. (1994). Quantities and units for electrophoresis in the clinical laboratory (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.* 66, 891–896. doi: 10.1351/pac199466040891
- Franco, R., and Pereira, E. (2013). “Gold nanoparticles and proteins, interaction,” in *Encyclopedia of Metalloproteins*, eds R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, and E. A. Permyakov (New York, NY: Springer), 908–915.
- Gigliotti, F., Haidaris, C. G., Wright, T. W., and Harmsen, A. G. (2002). Passive intranasal monoclonal antibody prophylaxis against murine *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect. Immun.* 70, 1069–1074.
- Gingo, M. R., Lucht, L., Daly, K. R., Djawe, K., Palella, F. J., Abraham, A. G., et al. (2011). Serologic responses to *Pneumocystis* proteins in human immunodeficiency virus patients with and without *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 57, 190–196. doi: 10.1097/QAI.0b013e3182167516
- Gomes, I., Feio, M. J., Santos, N. C., Eaton, P., Serro, A. P., Saramago, B., et al. (2012). Controlled adsorption of cytochrome c to nanostructured gold surfaces. *J. Nanopart. Res.* 14:1321. doi: 10.1007/s11051-012-1321-7
- Guirgis, B., Sáe Cunha, C., Gomes, I., Cavadas, M., Silva, I., Doria, G., et al. (2012). Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 1019–1027. doi: 10.1007/s00216-011-5489-y
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., and Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.* 79, 4215–4221. doi: 10.1021/ac0702084
- Hausser, P. M. (2019). Is the unique camouflage strategy of *Pneumocystis* associated with its particular niche within host lungs? *PLoS Pathog.* 15:e1007480. doi: 10.1371/journal.ppat.1007480
- Huang, L., Cattamanchi, A., Davis, J. L., den Boon, S., Kovacs, J., Meshnick, S., et al. (2011). International HIV-associated opportunistic pneumonias (IHOP) study; lung HIV study. HIV associated pneumocystis pneumonia. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 8, 294–300. doi: 10.1513/pats.201009-062WR
- Hughes, W. T. (2005). “*Pneumocystis* pneumonitis in non-HIV-infected patients: update,” in *Pneumocystis Pneumonia*, 3rd Edn, eds P. D. Walzer, and M. T. Cushion (New York, NY: Marcel Dekker, Inc.), 407–434.
- Kim, S., Wark, A. W., and Lee, H. J. (2016). Gel electrophoretic analysis of differently shaped interacting and non-interacting bioconjugated nanoparticles. *RSC Adv.* 6, 109613–109619.
- Kling, H. M., and Norris, K. A. (2016). Vaccine-induced immunogenicity and protection against *Pneumocystis* pneumonia in a nonhuman primate model of HIV and *Pneumocystis* coinfection. *J. Infect. Dis.* 213, 1586–1595. doi: 10.1093/infdis/jiw032
- Kolosoova, A. Y., De Saeger, S., Sibanda, L., Verheijen, R., and Van Peteghem, C. (2007). Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 2103–2107.
- Kutty, G., and Kovacs, J. A. (2003). A single-copy gene encodes Kex1, a serine endoprotease of *Pneumocystis jirovecii*. *Infect. Immun.* 71, 571–574.
- Li, X., Zhang, Q., Hou, P., Chen, M., Hui, W., Vermorken, A., et al. (2015). Gold magnetic nanoparticle conjugate-based lateral flow assay for the detection of IgM class antibodies related to TORCH infections. *Int. J. Mol. Med.* 36, 1319–1326. doi: 10.3892/ijmm.2015.2333
- Matos, O. (2012). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Africa: impact and implications of highly sensitive diagnostic technologies. *N. Am. J. Med. Sci.* 4, 486–487.
- Matos, O., and Esteves, F. (2016). “Laboratory diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia,” in *Microbiology of Respiratory System Infection*, eds K. Kon, and M. Rai (Amsterdam: Elsevier), 185–210.
- Matos, O., Tomás, A. L., and Antunes, F. (2017). “*Pneumocystis jirovecii* and PcP” in *Current Progress in Medical Mycology*, eds H. M. M. Montes, and L. M. Lopes-Bezerra (Cham: Springer International Publishing), 215–254.
- Medrano, F. J., Montes-Cano, M., Conde, M., De La Horra, C., Respaldiza, N., Gasch, A., et al. (2005). *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 245–250.
- Morris, A., and Norris, K. A. (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 297–317. doi: 10.1128/CMR.00013-12
- Morris, A. M., and Masur, H. (2011). A serologic test to diagnose *Pneumocystis* pneumonia: are we there yet? *Clin. Infect. Dis.* 53, 203–204. doi: 10.1093/cid/cir348
- Morrow, B. M., Samuel, C. M., Zampoli, M., Whitelaw, A., and Zar, H. J. (2014). *Pneumocystis* pneumonia in South African children diagnosed by molecular methods. *BMC Res. Notes* 7:26. doi: 10.1186/1756-0500-7-26
- Nagatani, N., Tanaka, R., Yuhi, T., Endo, T., Kerman, K., Takamura, Y., et al. (2006). Gold nanoparticle-based novel enhancement method for the development of highly sensitive immunochromatographic test strips. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 7, 270–275.
- O’Farrel, B. (2013). “Lateral flow immunoassay systems: evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays,” in *The Immunoassay Handbook*, ed. D. Wild (Oxford: Elsevier), 89–107.
- Ou, S. K., Hwang, J. M., and Patterson, P. H. (1993). A modified method for obtaining large amounts of high titer polyclonal ascites fluid. *J. Immunol. Methods* 165, 75–80. doi: 10.1016/0022-1759(93)90108-J
- Pöhlmann, C., Dieser, I., and Sprinzl, M. (2014). A lateral flow assay for identification of *Escherichia coli* by ribosomal RNA hybridisation. *Analyst* 139, 1063–1071. doi: 10.1039/c3an02059b
- Rapaka, R. R., Ricks, D. M., Alcorn, J. F., Cehn, K., Khader, S. A., Zheng, M., et al. (2010). Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*. *J. Exp. Med.* 207, 2907–2919. doi: 10.1084/jem.20100034
- Roux, A., Gonzalez, F., Roux, M., Mehrad, M., Menotti, J., Zahar, J. R., et al. (2014). Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Med. Mal. Infect.* 44, 185–198. doi: 10.1016/j.medmal.2014.01.007
- Santra, B., Shneider, M. N., and Car, R. (2017). In situ characterization of nanoparticles using Rayleigh scattering. *Sci. Rep.* 7:40230. doi: 10.1038/srep40230
- Singh, J., Sharma, S., and Nara, S. (2015). Nanogold based lateral flow assay for the detection of *Salmonella typhi* in environmental water samples. *Anal. Methods* 7, 9281–9288.
- Sotnikov, D. V., Zherdev, A. V., Avdienko, V. G., and Dzantiev, B. B. (2015). Immunochromatographic assay for serodiagnosis of tuberculosis using an antigen-colloidal gold conjugate. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51, 834–839.
- Sotnikov, D. V., Zherdev, A. V., and Dzantiev, B. B. (2018). Theoretical and experimental comparison of different formats of immunochromatographic serodiagnostics. *Sensors* 18:36. doi: 10.3390/s18010036
- Stringer, J. R., and Keely, S. P. (2001). Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 69, 627–639.
- Tomás, A. L., Cardoso, F., Esteves, F., and Matos, O. (2016). Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Sci. Rep.* 6:36287. doi: 10.1038/srep36287

# Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care

Tomás et al.

Gold-Based Immunodiagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia

- Tomás, A. L., and Matos, O. (2018). Current advances in laboratory diagnosis. *OBM Genet.* 2, 1–24. doi: 10.21926/obm.genet.1804049
- van Oosterhout, J. J., Laufer, M. K., Perez, M. A., Graham, S. M., Chimbiya, N., Thesing, P. C., et al. (2007). *Pneumocystis* pneumonia in HIV-positive adults, Malawi. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 325–328.
- Wakefield, A. E., Lindley, A. R., Ambrose, H. E., Denis, C. M., and Miller, R. F. (2003). Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Infect. Dis.* 187, 901–908.
- Wilson, R. (2008). The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem. Soc. Rev.* 37, 2028–2045. doi: 10.1039/b712179m
- Zhu, J., Zou, N., Mao, H., Wang, P., Zhu, D., Ji, H., et al. (2013). Evaluation of a modified lateral flow immunoassay for detection of high-sensitivity cardiac troponin I and myoglobin. *Biosens. Bioelectron.* 42, 522–525. doi: 10.1016/j.bios.2012.10.016

**Conflict of Interest:** AT, FC, and OM have a patent PT109078 pending to Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisbon, Portugal) related to the Msg RSA used in this study.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Tomás, de Almeida, Cardoso, Pinto, Pereira, Franco and Matos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Capítulo 4.

### **Detection of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in human serum using a recombinant synthetic multi-epitope kexin-based antigen**

Este capítulo corresponde ao artigo publicado em revista de circulação internacional com arbitragem científica:

**TOMÁS, A. L., CARDOSO, F., DE SOUSA, B., & MATOS, O. (2020)** Detection of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in human serum using a recombinant synthetic multi-epitope kexin-based antigen. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020; doi:10.1007/s10096-020-03936-2





## Detection of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in human serum using a recombinant synthetic multi-epitope kexin-based antigen

Ana Luísa Tomás<sup>1</sup> · Fernando Cardoso<sup>1</sup> · Bruno de Sousa<sup>2</sup> · Olga Matos<sup>1</sup> Received: 13 April 2020 / Accepted: 26 May 2020  
© The Author(s) 2020

### Abstract

Interest in the detection of specific anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies has emerged as less-invasive alternative diagnostic approaches. Here is presented the performance of an ELISA based on a recombinant synthetic multi-epitope kexin 1 (Kex1) antigen of *P. jirovecii*, previously developed. Results showed that IgM anti-Kex1 levels were found significantly increased in patients with *Pneumocystis* pneumonia (PcP) compared with non-PcP cases ( $p < 0.001$ ), allowing a diagnostic performance of PcP with a 70.8% sensitivity and a 75.0% specificity. These results suggest that this Kex1-based ELISA is a promising tool toward the serodiagnosis of PcP when the standard methods are difficult to perform.

**Keywords** *Pneumocystis* · Pneumocystosis · Kexin protease · Synthetic recombinant antigen · Serological diagnosis · ELISA

### Introduction

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PcP) is still the most commonly diagnosed acquired immune deficiency syndrome defining disease in Europe [1]. Likewise, the rising number of other immunocompromised patients susceptible to *P. jirovecii* infection [2] warrants the need for improved disease management strategies. Nowadays, PcP diagnosis still relies on microscopic visualization of the organisms or their DNA detection in specimens obtained by invasive and expensive techniques, difficult to perform in respiratory failure patients, in children, and in resource-limited settings [3, 4]. Therefore, an alternative diagnostic approach is required.

The interest in serum antibodies as alternative tools for PcP diagnosis has increased since the demonstration of the humoral immunity important role in disease resolution [5–8]. *Pneumocystis* major surface glycoproteins

(Msg), as its most abundant cell surface proteins, were the obvious candidates to start studying serological responses against PcP [9–14]. However, Msg' variability [15] may compromise the accuracy of serological tests when recombinant antigens of this protein are used. This limitation may be the reason for the low sensitivity (68.0%) and specificity (61.8%) of a previously developed Msg-based ELISA [14].

Therefore, new antigenic candidates have been explored. Reports of high human antibodies' titers to a recombinant subunit of *Pneumocystis* kexin-like serine protease (Kex1) correlated with a reduced incidence of PcP [13], protection against acquisition of *Pneumocystis* infection by vaccination with recombinant Kex1 peptides in immunosuppressed non-human primates [6], and the fact that Kex1 holds an antigenically stable active site sequence coded by a nuclear single-copy gene [16, 17] confirmed the interest in this protein. Thus, a newly recombinant synthetic (multi-epitope) antigen (RSA) based on the immunogenic behavior of *P. jirovecii* Kex1 was designed, produced, and applied in the development of a promising lateral flow immunoassay (LFIA) for PcP diagnosis [18]. However, the diagnostic performance of a Kex1-based ELISA is missing in order to understand if this new Kex1 RSA shows any diagnostic advantage over the previous Msg RSA. Therefore, we used IgG- and IgM

✉ Olga Matos  
omatos@ihmt.unl.pt

<sup>1</sup> Medical Parasitology Unit, Group of Opportunistic Protozoa/HIV and Other Protozoa, Global Health and Tropical Medicine, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal

<sup>2</sup> CINEICC, Faculdade de Psicologia e de Ciências da Educação, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal



Kex1-based ELISA to study sera from HIV-infected patients with and without PcP, in order to assess and discuss their applicability in PcP serodiagnosis.

## Material and methods

The design and purification process of the Kex1 RSA used in this study was previously described [18].

This was a retrospective observational study that included 76 sera from HIV-infected patients with a clinical picture of pulmonary disorders. Forty-eight sera samples were from patients with active PcP (positive laboratory detection of *P. jirovecii*) and 28 from patients with pneumonia due to other causes (negative laboratory detection of *P. jirovecii*), according to patient's categorization detailed in Tomás et al. 2019 [18]. The morbidities associated with pulmonary symptoms in patients without *P. jirovecii* infection were not known at the time of the patient's enrollment.

The Kex1 RSA was applied as antigenic tool in an indirect ELISA to detect IgG and IgM anti-*P. jirovecii* in patients' sera. All volumes used were of 50  $\mu$ L/well if not otherwise mentioned. Microplate odd-numbered columns were coated with Kex1 RSA (5  $\mu$ g/mL in carbonate buffer pH 8.4) and even-numbered columns with PBS 1x (control), overnight at 4 °C. Plates were washed with washing buffer (PBS with 0.05% Tween-20) and blocked with blocking buffer (1% polyvinyl alcohol, 70  $\mu$ L/well) for 1 h at 20–25 °C. The blocking buffer was removed, and serum was added to each well with a specific dilution concerning the immunoglobulin to detect (1/20 dilution in washing buffer for IgM and 1/40 dilution in washing buffer for IgG). Plates were incubated (1 h, 37 °C) and washed three times with washing buffer and one time with distilled water. An alkaline phosphatase-labeled monoclonal antihuman immunoglobulin G (A2064, sigma®) or M (A2189, sigma®) was added to each well (1/3000 or 1/1000 dilution in washing buffer, respectively) for 1 h at 37 °C. After repeating the washing steps, 4-nitrophenylphosphate sodium salt (1 mg mL<sup>-1</sup>) was added. Color developed overnight at 4 °C, and reading was performed at a wavelength of 405 nm (Infinite 200 Pro, Tecan®). ELISA results were determined for each specimen in duplicate in even- and odd-numbered columns. The mean of the even-numbered wells was deducted from the mean of the odd-numbered wells to obtain the final read for each sample.

Statistical analysis was performed at 0.05 significance level using the IBM SPSS version 20.0 and the open source R software version 4.0.0 [19, 20]. The non-parametric Mann-Whitney *U* test was used to examine the differences between the distribution of antibodies' titers in patients with and without PcP. The Cohen's *d* effect size for both IgG and IgM tests was calculated based on sample size of 48 PcP patients and 24 non-PcP patients and a significance level of 5% with the

effsize package version 0.8.0 [21] from R Project software [20]. Receiver operating characteristic (ROC) curves, sensitivity, specificity, positive/negative predictive values, and likelihood ratios of the ELISA were calculated using the R package "optimal cut-points" [19]. With the "MaxSpSe" criteria of this package, optimal cut-off values were calculated [22, 23], to simultaneously maximize the sensitivity and specificity of the ELISA.

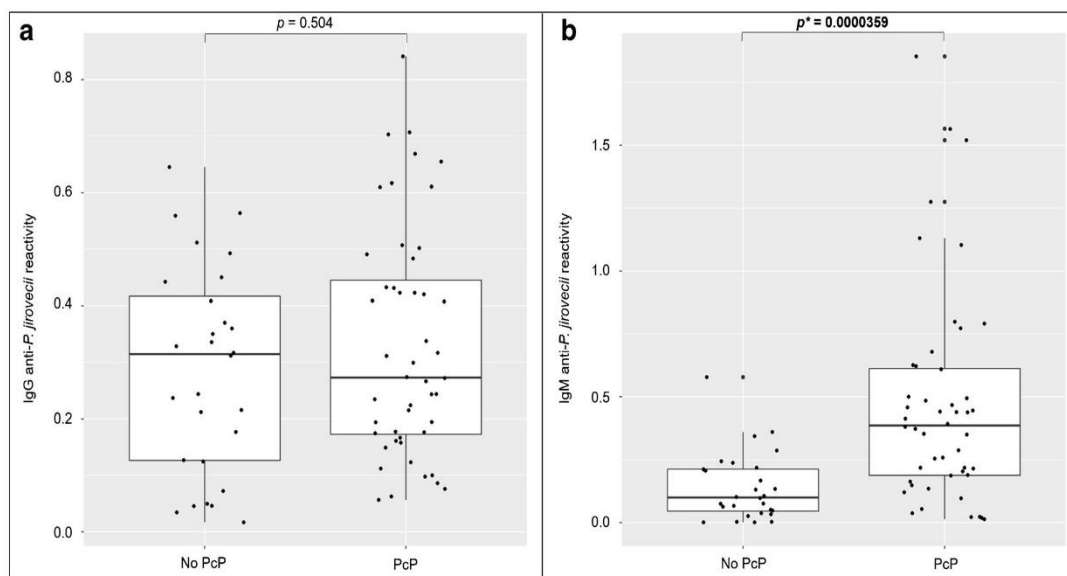
## Results

ELISA was developed for detection of specific IgG and IgM anti-*P. jirovecii* antibodies in sera, applying the Kex1 RSA as antigenic tool. The distribution of the IgG and IgM anti-*P. jirovecii* reactivity levels across PcP and non-PcP patients is presented in Fig. 1. The median reactivity levels of the IgG anti-*P. jirovecii* detected in PcP patients were not statistically different ( $p = 0.504$ ) from the levels detected in patients with pneumonia due to other causes. However, IgM anti-*P. jirovecii* median reactivity levels were statistically higher in PcP patients (0.3871) compared with non-PcP patients (0.0997), showing applicability in the discrimination of these two groups of patients. Although a moderate sample size, the computed achieved power for IgG and IgM was 94.5% and 76.5%, respectively, based on a Cohen's *d* of  $-0.858$  for IgG and  $-0.646$  for IgM. The assay ROC curve is represented in Fig. 2, showing an area under the curve of 80.1%. Optimal cut-off values were determined for PcP diagnosis based on IgM anti-*P. jirovecii* reactivity levels, and a value of 0.2149 was determined as the best to maximize both the specificity and the sensitivity of the assay. The diagnostic performance of the developed Kex1 RSA-based IgM ELISA is presented in Table 1 and indicates a sensitivity of 70.8%, specificity of 75.0%, and positive and negative predictive values of 82.9% and 60.0%, respectively.

## Discussion

PcP diagnosis is currently based on microscopic visualization of *P. jirovecii*, using cytochemical or IF-Mab staining, and/or detection of its DNA in the affected tissues [3, 4]. The gold-standard biological specimens for these tests (bronchoalveolar lavage or induced sputum) are obtained by invasive and expensive techniques, not always available or feasible to perform in patients with respiratory failure, in children, or in countries with limited resources [3, 4]. Therefore, the demand for an alternative using less demanding technologies and minimally invasive biological specimens directed attention and interest to blood and serum.

Although it has been demonstrated the applicability of recombinant antigens of *P. jirovecii* proteins in seroprevalence



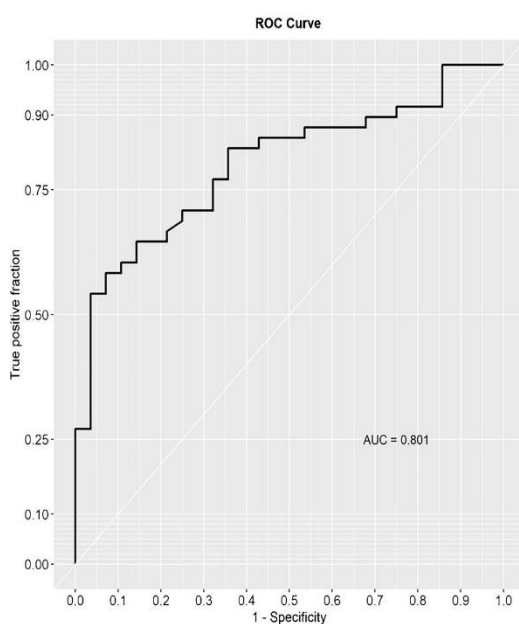
**Fig. 1** Simple boxplots showing the reactivity levels (OD at 405 nm) of IgG (a) and IgM (b) anti-*P. jirovecii* antibodies detected by ELISA protocols applied with the Kex1 RSA across patients with PcP and

patients with pneumonia due to other cases (no PcP). The statistic values ( $p^*$ ), representing a statistically significant difference from Mann-Whitney  $U$  tests performed between the groups, are highlighted

studies [10–13], their application in the development of a less-invasive approach for PcP diagnosis is just in the initial stage [12, 14, 18]. Recently, our research group designed and developed an Msg RSA-based ELISA that proved to have application as a serological approach for PcP diagnosis [14]. Though, its performance was not as good as intended, possibly due to *P. jirovecii* evasion mechanism based on Msg

antigenic variation [15]. Thus, we produced a new RSA based on the immunogenic behavior of *P. jirovecii* Kex1 protein. The idea was to create an RSA from a single-copy protein [17] with an important role in disease protection [6, 13], avoiding the genetic variation feature that Msg exhibits [15].

As previously demonstrated [18], this new Kex1 RSA showed applicability in the detection of specific IgM anti-*P. jirovecii* antibodies when applied as an antigenic tool in LFIA techniques to study active PcP in human sera. However, this brief research note aims to present the



**Fig. 2** Representation of Kex1-based IgM ELISA ROC curve

**Table 1** Accuracy measures of the Kex1 RSA-based IgM ELISA for PcP diagnosis

Kex1 RSA-based IgM ELISA	
Sensitivity	70.8%
(CI)	(55.9–83.0%)
Specificity	75.0%
(CI)	(55.1–89.3%)
Positive predictive value	60.0%
(CI)	(66.5–90.7%)
Negative predictive value	82.9%
(CI)	(43.9–80.7%)
Positive likelihood ratio	2.83
(CI)	(1.45–5.52)
Negative likelihood ratio	0.39
(CI)	(0.24–0.63)



diagnostic performance of a Kex1-based ELISA and discuss their implications for future guidelines for new diagnostic studies in the area of *Pneumocystis* pneumonia. For that purpose, the detection of IgG and IgM anti-*P. jirovecii* antibodies was performed in sera of 48 patients with active PcP and 28 patients with pneumonia due to other causes.

With the Kex1 RSA-based IgG ELISA, it was not possible to distinguish PcP and non-PcP patients (Fig. 1). An achieved power of 94.5% supports that the non-statistically significant differences found between IgG levels of PcP and non-PcP patients are not trivial. This result was also observed with the Msg RSA [14, 18] and may be explained by the previous colonization with *P. jirovecii* of patients presenting diverse levels of immunodeficiency, primary respiratory disorders, or even in the immunocompetent general population [8, 24, 25]. In contrast, the Kex1 RSA-based IgM ELISA showed successful application in discriminating PcP and non-PcP patients (Fig. 1), since IgM levels were detected significantly increased in patients with PcP ( $p < 0.0001$ ). These results corroborate our previous findings with the Msg RSA and what was verified in studies with mice, which suggest that the IgM isotype has a predominant role in shaping the earliest steps in the recognition and clearance of *P. jirovecii* infection [14, 26]. However, it should be noted that this Kex1 RSA-based IgM ELISA presented a higher sensitivity (from 68.0 to 70.8%) and specificity (from 61.8 to 75.0%) for PcP diagnosis compared with our previous Msg RSA-based IgM ELISA, with a moderately high positive diagnostic likelihood ratio (2.83) and low negative diagnostic likelihood ratio (0.39) (Table 1). This was also consistent with preliminary results obtained with both Kex1 and Msg LFIA developed [18] and possibly can be explained by Msg genetic variation during infection, which could lead to false-negative results and a lower capacity of Msg RSA to detect anti-*P. jirovecii* antibodies in all disease phases.

With this brief research report, we show that this new Kex1 RSA-based ELISA has a high diagnostic potential and reinforces the idea that RSA is one of the most promising tools to achieve routine PcP serodiagnosis. We hope that this will support the development of new studies focused on Kex1 RSA-based strategies, in order to validate and optimize a simpler, faster, and less invasive diagnostic solution to overcome current diagnostic challenges, especially in resource-limited settings.

**Author contributions** ALT and OM were responsible for the study design and wrote the manuscript.

ALT and FC performed the experiments and ALT, and BdS ensured the statistical analysis of data.

OM was responsible for reagents/materials/analysis tool supplies.

All authors contributed to the approval of the final version of the manuscript.

**Funding information** This work was partially supported by grants from the ERANet-LAC (Network of the European Union, Latin America and

the Caribbean Countries on Joint Innovation and Research Activities) (ELAC2014/HID-0254) to OM and from the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/108433/2015) to ALT. Authors declare that funding sources had no role in the study design, data collection, data interpretation or writing of the report.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethics approval** The Instituto de Higiene e Medicina Tropical ethics committee approved the study's protocol and waived informed consent as a retrospective observational study.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

1. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe (2019) HIV/AIDS surveillance in Europe 2019 – 2018 data. ECDC, Stockholm
2. Roux A, Gonzalez F, Roux M et al (2014) Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Med Mal Infect* 44(5):185–198
3. Matos O, Esteves F (2016) Laboratory diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. In: Kon K, Rai M (eds) . Elsevier, Microbiology of respiratory system infection, pp 185–210
4. Matos O, Tomás AL, Antunes F (2017) *Pneumocystis jirovecii* and PcP. In: Montes HMM, Lopes-Bezerra LM (eds) Current Progress in Medical Mycology. Springer International Publishing, Switzerland, pp 215–254
5. Gigliotti F, Haidaris CG, Wright TW, Harmsen AG (2002) Passive intranasal monoclonal antibody prophylaxis against murine *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun* 70:1069–1074
6. Kling HM, Norris KA (2016) Vaccine-induced immunogenicity and protection against *Pneumocystis* pneumonia in a nonhuman primate model of HIV and *Pneumocystis* coinfection. *J Infect Dis* 213:1586–1595
7. Milledge J, Kakakios A, Gillis J, Fitzgerald DA (2003) *Pneumocystis carinii* pneumonia as a presenting feature of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Paediatr Child Health* 39:704–706
8. Morris A, Norris KA (2012) Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 25:297–317
9. Stringer JR, Keely SP (2001) Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 69(2):627–639
10. Blount RJ, Jarlsberg LG, Daly KR et al (2012) Serologic responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein among Uganda patients with respiratory symptoms. *PLoS One* 7: e51545



11. Daly KR, Koch J, Levin L, Walzer PD (2004) Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* 10:848–854
12. Djawe K, Huang L, Daly KR et al (2010) Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. *PLoS One* 5: e14259
13. Gingo MR, Lucht L, Daly KR et al (2011) Serologic responses to *Pneumocystis* proteins in human immunodeficiency virus patients with and without *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 57:190–196
14. Tomás AL, Cardoso F, Esteves F, Matos O (2016) Serological diagnosis of Pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Sci Rep* 6:36287
15. Hauser PM (2019) Is the unique camouflage strategy of *Pneumocystis* associated with its particular niche within host lungs? *PLoS Pathog* 15(1):e1007480
16. Esteves F, Tavares A, Costa MC et al (2009) Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of *Pneumocystis jirovecii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(2):175–178
17. Kuty G, Kovacs JA (2003) A single-copy gene encodes Kex1, a serine endoprotease of *Pneumocystis jirovecii*. *Infect Immun* 71(1): 571–574
18. Tomás AL, de Almeida MP, Cardoso F et al (2019) Development of a gold nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for *Pneumocystis* pneumonia serological diagnosis at point-of-care. *Front Microbiol* 10:2917
19. López-Ratón M, Rodríguez-Álvarez MX, Cardoso-Suárez C, Gude-Samper F (2014) OptimalCut-points: an R package for selecting optimal cut-points in diagnostic tests. *J Stat Softw* 61(8): 1–36
20. R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna Available from: <https://www.R-project.org/>
21. Torchiano M (2020) Effsize: efficient effect size computation. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1480624>
22. Gallop RJ, Crits-Christoph P, Muenz LR, Tu XM (2003) Determination and interpretation of the optimal operating point for ROC curves derived through generalized linear models. *Underst Stat* 2(4):219–242
23. Riddle DL, Stratford PW (1999) Interpreting validity indexes for diagnostic tests: an illustration using the Berg balance test. *Phys Ther* 79:939–950
24. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M et al (2005) *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis* 11:245–250
25. Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE et al (2003) Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 187:901–908
26. Rapaka RR, Ricks DM, Alcorn JF et al (2010) Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*. *J Exp Med* 207(20): 2907–2919

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Detection of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in human serum using a recombinant synthetic multi-epitope kexin-based antigen

## **Capítulo 5.**

### **Discussão Geral e Conclusões**



### 5.1 Discussão geral

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc) continua a ser uma patologia mundialmente associada à infecção por VIH, representando um importante fator de morbilidade e mortalidade nestes doentes (Brown *et al.*, 2012; Armstrong, Meintjes & Brown, 2014; Bongomin *et al.*, 2017; GAFFI, 2017). Adicionalmente, o aumento do número de casos de PPc noutros grupos de doentes imunocomprometidos, associado ao aumento do uso de agentes imunossuppressores por longos períodos de tempo ou em doses elevadas (Rodriguez *et al.*, 2004; Monnet *et al.*, 2008; Maini *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Bienvenu *et al.*, 2016), tem reforçado a importância clínica desta infecção na saúde pública mundial. Assim, cada vez mais o diagnóstico precoce desta doença se reveste de grande importância, uma vez que a sua resolução está estritamente relacionada com o estabelecimento de uma terapêutica adequada, o mais precocemente possível (Matos, Tomás & Antunes, 2017).

Presentemente, o diagnóstico clínico da PPc continua a representar um desafio. Em primeiro lugar, porque não existem sinais ou sintomas patognomónicos desta doença, bem como achados radiológicos ou gasométricos específicos, o que torna o diagnóstico clínico dependente de achados laboratoriais que confirmem a infecção por *P. jirovecii* (Matos, Tomás & Antunes, 2017; Tomás & Matos, 2018). Em segundo lugar, porque esses achados laboratoriais específicos são, atualmente, dependentes da obtenção de amostras respiratórias por técnicas invasivas, onerosas e de difícil execução em doentes com insuficiência respiratória ou em crianças, e especialmente difíceis de implementar em regiões com recursos financeiros limitados (Matos, Tomás & Antunes, 2017; Tomás & Matos, 2018).

Assim, o desenvolvimento de um teste de diagnóstico mais rápido e barato, independente de equipamentos e infraestruturas especializadas e que utilize amostras biológicas obtidas de forma minimamente invasiva, como o sangue, é uma necessidade premente, pois representará um grande benefício para o doente e uma melhoria no controlo clínico desta doença.

Nessa perspetiva, têm sido direcionados esforços para a descoberta de biomarcadores serológicos. Esses biomarcadores são, por norma, moléculas representativas e específicas do microrganismo causador da infecção ou moléculas do hospedeiro produzidas em resposta à infecção, as quais são libertadas em quantidades suficientes para serem

detetadas em misturas complexas, como em amostras de sangue (Kierny, Cunningham & Kay, 2012). Até aos dias de hoje, ainda não foi possível estabelecer um teste para o diagnóstico da PPc baseado em nenhum dos biomarcadores serológicos estudados (S-adenosilmetionina, glicoproteína KL-6, lactato desidrogenase e  $\beta$ -glucano), pois nenhum deles se mostrou específico da infeção por *P. jirovecii* (Matos, Tomás & Antunes, 2017; Tomás & Matos, 2018). O  $\beta$ -glucano é um componente estrutural de *P. jirovecii* que também está presente em outros fungos, podendo ocorrer aumento dos seus níveis séricos durante outras infeções que não a PPc (Finkelman, 2010; Esteves *et al.*, 2015). Já os níveis séricos das proteínas LDH e KL-6, no caso da infeção por PPc, encontram-se elevados em resposta à lesão do parênquima pulmonar. Porém, qualquer outro fator que conduza a lesão celular ou, particularmente, à lesão das células epiteliais pulmonares, pode também estar na origem da elevação da LDH e KL-6, respetivamente (Tasaka *et al.*, 2007; Esteves *et al.*, 2015). Por fim, a aplicabilidade da SAM enquanto biomarcador da PPc tem suscitado discórdia entre diversos autores, não estando bem definida qual a relação dos seus níveis séricos com a infeção por *P. jirovecii* (Matos, Tomás & Antunes, 2017; Tomás & Matos, 2018).

Neste contexto, o estudo da resposta imunitária do hospedeiro às proteínas de superfície específicas de *P. jirovecii* surgiu como uma alternativa na identificação de novos biomarcadores adequados ao diagnóstico serológico da PPc, com base nos níveis séricos de anticorpos específicos, produzidos em resposta à infeção por este fungo oportunista (Daly *et al.*, 2002; Bishop & Kovacs, 2003; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009; Tipirneni *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Djawe *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011; Blount *et al.*, 2012; Djawe *et al.*, 2013; Tomás *et al.*, 2016; Tomás *et al.*, 2019). Com base nesta perspetiva, surgiu o trabalho aqui apresentado.

As primeiras investigações nesta área surgiram através do estudo da reatividade de soros de indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, com e sem história prévia ou atual de PPc, em relação a frações recombinantes da região amino-terminal (MsgA), intermédia (MsgB) e carboxilo-terminal (MsgC) da Msg nativa de *P. jirovecii* (Daly *et al.*, 2002; Daly *et al.*, 2004; Tipirneni *et al.*, 2009; Blount *et al.*, 2012). Os resultados desses estudos demonstram que tem sido difícil manter um consenso em termos de aplicabilidade dos resultados obtidos, pois diferentes autores têm estudado a resposta imunitária de diferentes populações em relação a diferentes frações recombinantes da

Msg de *P. jirovecii* (ver quadro 4 do capítulo 1 nas págs. 42-43). No entanto, um achado laboratorial foi consistente em todos esses estudos: a reatividade dos anticorpos produzidos contra a região carboxilo-terminal da Msg de *P. jirovecii*, era a que melhor permitia a distinção entre indivíduos com exposição prévia ou infecção ativa por *P. jirovecii*, de doentes sem episódios prévios ou sem infecção por este microrganismo.

Assim, o capítulo 2 desta dissertação, composto pelo artigo intitulado “*Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of Pneumocystis jirovecii*” publicado em 2016, expõe o início do trabalho aqui apresentado: o desenho, produção e purificação de um único antigénio recombinante sintético (ARS) multi-epítipo construído com base no estudo *in silico* da imunogenicidade da sequência de aminoácidos da região terminal da porção intermédia (MsgB) e de toda a região carboxilo-terminal (MsgC) da Msg nativa de *P. jirovecii* (Tomás *et al.*, 2016).

Esta tecnologia de produção de antígenos sintéticos multi-epítipo já tinha demonstrado aplicabilidade no desenvolvimento de métodos serológicos de deteção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Dai *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2013). Com esta abordagem, numa única ferramenta antigénica, ficam disponíveis vários epítopos diferentes, altamente imunogénicos, provenientes de sequências de aminoácidos que não estão próximas entre si na molécula nativa. Deste modo, esta ferramenta antigénica permite a deteção de diferentes anticorpos anti-*P. jirovecii* num único ensaio, aumentando a sua sensibilidade. O ARS da Msg de *P. jirovecii* desenvolvido neste trabalho foi desenhado com base na avaliação de propriedades físico-químicas (estrutura secundária, polaridade, posição relativa à membrana, acessibilidade, antigenicidade, flexibilidade e índice de hidrofobicidade) da sequência de aminoácidos correspondente às regiões indicadas. Primeiro foram identificadas as regiões com elevado índice de polaridade, acessibilidade, flexibilidade, antigenicidade e hidrofília, que tivessem uma posição externa relativa à membrana, pois estas características atribuem ao ARS maior probabilidade de interação com outras macromoléculas, como por exemplo anticorpos. Depois de identificadas estas regiões, a sequência nucleotídica analisada foi alinhada com outras sequências nucleotídicas previamente depositadas em bancos de dados internacionais para o gene codificador da Msg de *P. jirovecii*, por forma a identificar as regiões mais conservadas desta proteína, limitando a seleção dos epítopos constituintes do ARS a estas regiões.

Seguidamente, todas as regiões passíveis de serem selecionadas foram estudadas relativamente à sua semelhança com outras sequências depositadas em bases de dados internacionais (NCBI Blast), com vista à seleção de regiões que fossem, exclusivamente, semelhantes a proteínas de *Pneumocystis*. Este passo atribui especificidade a esta ferramenta antigénica uma vez que, ao garantir que os seus constituintes são exclusivamente específicos de *Pneumocystis*, estamos a diminuir a probabilidade de ocorrência de reatividade cruzada com anticorpos reativos contra proteínas semelhantes de outros microrganismos ou do próprio hospedeiro.

O ARS final desenhado é então constituído por três epítomos imunogénicos da Msg nativa de *P. jirovecii* (ver figura 1 do capítulo 2 na pág. 122), intervalados entre si por duas pontes de glicina, que funcionam como “dobradiças” não reativas, possibilitando que os três fragmentos proteicos adquiram a sua estrutura tridimensional própria, e que mantenham uma distância entre si que permita a sua interação individual com os respetivos anticorpos. Após clonagem em vetor de expressão adequado, este antigénio foi expresso com uma cauda adicional contendo seis resíduos de histidina, que permitiu a sua purificação por cromatografia de afinidade com iões metálicos.

Este ARS purificado foi então aplicado no desenvolvimento de uma técnica ELISA para deteção de anticorpos (IgG, IgM e Ig totais) produzidos especificamente em resposta à infeção por *P. jirovecii*, através da avaliação dos níveis séricos desses anticorpos em indivíduos imunocompetentes (doadores de sangue) e em doentes imunocomprometidos categorizados em quatro grupos clínicos distintos, relativamente à infeção por *P. jirovecii* (doentes com PPc, doentes colonizados por *P. jirovecii*, doentes sem infeção por *P. jirovecii* e doentes sem infeção por *P. jirovecii* mas com outras infeções fúngicas, ver quadro 1 do capítulo 2 na pág. 120).

A avaliação dos níveis de anticorpos nestes cinco grupos clínicos teve três objetivos distintos e complementares: i) determinar se doentes imunocomprometidos, maioritariamente seropositivos para VIH (85%) conseguiam montar uma resposta imunitária contra a infeção por *P. jirovecii*; ii) comprovar a especificidade do ARS produzido, avaliando a reatividade de soros de doentes sem infeção por *P. jirovecii* mas com outras infeções fúngicas; iii) determinar a aplicabilidade desta ferramenta antigénica e da técnica ELISA desenvolvida no diagnóstico serológico da PPc, com base na hipótese de que doentes de diferentes grupos clínicos apresentariam, previsivelmente, diferentes



níveis de reatividade serológica anti-*P. jirovecii*.

Ao contrário do que alguns estudos anteriores sugeriam (Bishop & Kovacs, 2003; Blount *et al.*, 2012; Djawe *et al.*, 2013), no presente estudo com este ARS da Msg de *P. jirovecii*, foi possível detetar a presença de uma resposta imunitária contra a infeção por este fungo em seropositivos para VIH, uma vez que os níveis de anticorpos totais e IgM reativos contra este antigénio estavam estatisticamente aumentados em doentes imunocomprometidos com PPc, comparativamente aos níveis encontrados em indivíduos imunocompetentes (dadores de sangue, ver figura 2 do capítulo 2 na pág. 123). Tal demonstra que o alto grau de imunossupressão que normalmente está presente em doentes que contraem PPc, não inviabiliza a produção de anticorpos reativos contra o agente patogénico nem a utilização de um método serológico para determinação do estágio da infeção.

Os resultados deste estudo também confirmaram a especificidade do antigénio produzido, uma vez que o nível de reatividade dos anticorpos IgG e IgM detetados em doentes com outras infeções fúngicas usando este ARS, foi sempre significativamente menor que o nível de reatividade detetado em doentes com infeção por *P. jirovecii* (ver figura 2 do capítulo 2 na pág. 123). Estes dados reforçam a ausência de reatividade cruzada entre o ARS produzido e anticorpos produzidos em resposta à infeção ativa por outros fungos.

Por fim, os resultados obtidos permitiram concluir que somente os níveis serológicos de anticorpos IgM reativos contra o ARS produzido, podem ser considerados bons marcadores serológicos de PPc ativa, contrariamente ao relatado em estudos anteriores (Djawe *et al.*, 2010; Djawe *et al.*, 2013). Nesses estudos anteriores, quer os níveis séricos de IgG quer os níveis séricos de IgM reativos contra as frações recombinantes da MsgC estudadas, foram encontrados mais elevados em doentes seropositivos para VIH com história prévia de PPc ou infeção ativa, comparativamente a doentes sem história prévia ou PPc ativa (ver quadro 4 do capítulo 1 nas págs. 42-43). No estudo aqui apresentado, embora níveis altos de anticorpos totais e IgG anti-*P. jirovecii* também tenham sido detetados em doentes com PPc ativa, a diferença nos níveis desses anticorpos entre os diferentes grupos clínicos não foi estatisticamente significativa e não permitiu distinguir doentes com infeção ativa de doentes colonizados ou sem infeção por *P. jirovecii*. Em contraste, os níveis de IgM anti-*P. jirovecii* apresentaram-se estatisticamente mais elevados em doentes com PPc do que em doentes sem infeção por *P. jirovecii* (com ou

sem outra infecção fúngica), mostrando que os seus níveis séricos permitem inferir a presença ou ausência de doença (ver figura 2 do capítulo 2 na pág. 123). Contudo, não se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de anticorpos IgM anti-*P. jirovecii* detetados entre doentes com infecção ativa (doentes com PPc) e doentes com infecção assintomática por *P. jirovecii* (doentes colonizados por *P. jirovecii*), o que impossibilita a utilização dos níveis séricos destes anticorpos na distinção destes dois grupos de doentes.

De seguida, foi feita a extrapolação da aplicabilidade da técnica ELISA desenvolvida com o ARS da Msg para pesquisa de IgM reativas contra este antígeno, no serodiagnóstico da PPc. Como teste laboratorial isolado, esta técnica não apresenta um desempenho de excelência (sensibilidade de 68% e especificidade de 61,8%, ver quadro 2 do capítulo 2 na pág. 124), o que pode ser explicado exatamente pela sua incapacidade em distinguir doentes com infecção ativa de doentes colonizados. Todavia, a sua aplicação em associação com critérios clínicos, que permitem inferir a presença ou não de sintomas e sinais compatíveis com uma infecção ativa, dá origem a uma abordagem alternativa de diagnóstico da PPc, que apresenta uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 80.8% (ver quadro 3 do capítulo 2 na pág. 124) e que é passível de ser executada com uma amostra biológica de obtenção minimamente invasiva, como o sangue.

Considerando as diretrizes fornecidas neste estudo inicial, e numa tentativa de melhorar os resultados obtidos, surgiram os resultados apresentados nos capítulos 3 e 4 desta dissertação, onde um segundo antígeno sintético específico de *P. jirovecii* baseado na sua protease de serina kexina 1 (Kex1) foi desenhado e também aplicado na melhoria da abordagem serodiagnóstica da PPc (Tomás *et al.*, 2019).

O desenho deste novo ARS da Kex1 como ferramenta antigénica alternativa, surgiu com base em três evidências. **A primeira** é a correlação da resposta humoral à proteína Kex1 com o risco de desenvolvimento de PPc, já que estudos de seroprevalência em humanos (Gingo *et al.*, 2011) e de imunização em modelos símios (Kling and Norris, 2016), têm demonstrado que níveis altos de anticorpos reativos contra antígenos recombinantes desta proteína, estão correlacionados com diminuição do risco de desenvolvimento da doença. Esta evidência suporta a importância da resposta humoral face a esta proteína e justifica a sua utilização como ferramenta antigénica numa abordagem de serodiagnóstico da PPc. **A segunda evidência** que suporta a utilidade de uma ferramenta antigénica

desenhada com base nesta proteína prende-se com o facto da Kex1 ser codificada por um gene de cópia única (Kutty and Kovacs, 2003). Esta característica é importante, tendo em consideração uma **terceira evidência**, que se baseia na variabilidade antigénica da Msg de *P. jirovecii*, descrita e associada a um mecanismo de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro (Stringer & Keely, 2001; Hauser, 2019). Uma vez que a Msg de *P. jirovecii* é codificada por uma família de seis genes multi-cópia (Ma *et al.*, 2016; Hauser, 2019), este microrganismo é capaz de expressar células com glicoproteínas de superfície diferentes entre si, em qualquer momento da infeção. Tal pode comprometer o desempenho de uma abordagem de serodiagnóstico baseada exclusivamente na avaliação da resposta imunitária a estas glicoproteínas. Assim, numa tentativa de cobrir de forma mais eficiente a resposta imunitária do hospedeiro face à infeção por *P. jirovecii*, foi também desenhada uma ferramenta antigénica alternativa baseada numa proteína imunogénica de *P. jirovecii* sem variação genética descrita, a Kex1.

Este novo antígeno foi desenhado, produzido e purificado da mesma forma que o ARS da Msg de *P. jirovecii* (Tomás *et al.*, 2019), com apenas uma diferença para a seleção dos epítomos constituintes deste ARS da Kex1. A sequência do gene da proteína foi analisada na sua totalidade, pois não existem estudos que demonstrem uma determinada região como mais ou menos adequada para estudos serológicos. Assim, após análise *in silico* das mesmas propriedades físico-químicas enunciadas para o desenho do ARS da Msg, produziu-se e purificou-se um antígeno recombinante sintético da Kex1 de *P. jirovecii* constituído por três epítomos imunogénicos, com sequências de aminoácidos conservadas e específicas de *Pneumocystis*.

À semelhança do estudo apresentado no capítulo 2, os estudos apresentados nos capítulos 3 e 4 desta dissertação, partem da aplicação deste novo ARS da Kex1 na deteção serológica de anticorpos específicos anti-*P. jirovecii* em formato ELISA. A abordagem destes estudos diferencia-se da do estudo anterior (Tomás *et al.*, 2016) ao reduzir para dois os grupos clínicos estudados: doentes com infeção por *P. jirovecii* e doentes sem infeção por *P. jirovecii*. A principal razão por detrás desta mudança de abordagem prende-se com o facto de este projeto de doutoramento ter o objetivo primordial de validar o potencial destes ARS na deteção de anticorpos séricos anti-*P. jirovecii* específicos, com vista ao desenvolvimento de uma abordagem de diagnóstico serológico da PPc. No grupo clínico constituído por dadores de sangue, não há uma caracterização correta dos

indivíduos quanto à presença ou ausência de *P. jirovecii* nos seus pulmões devido à ausência de amostras respiratórias para avaliação laboratorial. Assim, uma vez que no estudo anterior já tínhamos comprovado que doentes imunocomprometidos eram capazes de montar uma resposta imunitária face à infeção por *P. jirovecii* comparando os níveis séricos dos anticorpos destes doentes com os dos dadores de sangue, nestes estudos posteriores este grupo clínico não foi considerado.

Relativamente ao grupo clínico composto por indivíduos colonizados por *P. jirovecii*, o mesmo não foi incluído nestes estudos subsequentes devido à ausência do acompanhamento da progressão deste grupo. Por se tratar de um estudo observacional retrospectivo, não podemos garantir, apesar da ausência de sintomas e sinais compatíveis com a PPc ativa no momento da admissão no estudo, que esses indivíduos colonizados não tenham progredido posteriormente para PPc ativa. Por outro lado, a ausência de significância estatística entre a mediana dos níveis séricos de anticorpos IgM, IgG e Ig totais anti-*P. jirovecii* destes indivíduos colonizados e dos doentes com PPc ativa no estudo anterior (ver figura 2 do capítulo 2 na pág. 123) sugere que, embora a infeção ainda seja assintomática, estes indivíduos desenvolvem uma resposta imunitária em reação à invasão dos pulmões por *P. jirovecii*. Assim, esta abordagem de diagnóstico parece não ser adequada para distinguir estes grupos de doentes.

Os restantes grupos de doentes estudados no trabalho publicado em 2016, foram reunidos nos dois grupos clínicos de interesse, consoante a presença ou ausência de deteção de infeção por *P. jirovecii* nas suas amostras respiratórias. O grupo clínico de doentes sem infeção por *P. jirovecii* foi constituído por doentes com exames laboratoriais (IF-AcM/nPCR) negativos, com ou sem infeção por outras doenças fúngicas, pois o número remanescente de amostras de doentes com outras infeções fúngicas era insuficiente para a formação de um grupo clínico distinto. O grupo clínico de doentes com infeção por *P. jirovecii*, foi constituído por doentes sintomáticos com testes laboratoriais (IF-AcM/nPCR) positivos. O estudo destes dois grupos tem como objetivo avaliar a capacidade da abordagem serodiagnóstica de fornecer ao clínico uma resposta relativamente à presença ou ausência de infeção por *P. jirovecii*, para que ele possa, em conjunto com os dados clínicos, tomar a decisão terapêutica.

Os resultados obtidos nos estudos posteriores intitulados “*Development of a gold nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for Pneumocystis pneumonia serological*

*diagnosis at point-of-care*” e “*Detection of anti-Pneumocystis jirovecii antibodies in human serum using a recombinant synthetic multi-epitope kexin-based antigen*”, apresentados respetivamente nos capítulos 3 e 4 da presente dissertação, vieram corroborar as constatações provenientes do estudo apresentado no capítulo 2. Nos três estudos, somente os níveis de IgM anti-*P. jirovecii* mostraram aplicabilidade como biomarcadores serológicos de infeção ativa nos ELISA desenvolvidos quer com o ARS da Msg quer com o ARS da Kex1 (ver figura 2 do capítulo 2 na pág. 123, ver figura 3 do capítulo 3 na pág. 137 e ver figura 1 do capítulo 4 na pág. 153). Assim, estes resultados vêm, uma vez mais, salientar a importância e utilidade da deteção de anticorpos da classe IgM no desenvolvimento de uma abordagem de serodiagnóstico da PPc. Esta evidência é ainda apoiada por estudos prévios realizados em murganhos, que sugerem que esta classe de anticorpos apresenta um papel predominante no reconhecimento e eliminação da infeção por *P. jirovecii* (Rapaka *et al.*, 2010).

Particularmente, o estudo apresentado no capítulo 3, para além de confirmar a aplicabilidade dos dois ARS produzidos na deteção de IgM anti-*P. jirovecii* em ELISA, apresenta uma abordagem alternativa, com vista à transformação de testes serológicos clássicos em testes serológicos com aplicação no local de prestação de cuidados de saúde (*point-of-care*). Este tipo de estudos é importante na medida em que cada vez mais se pretendem métodos de diagnóstico descentralizados, isto é, que requeiram pouca ou nenhuma infraestrutura de apoio. Os testes de tira baseados em fluxo lateral em membrana descartável são a melhor resposta a esta necessidade, pois são métodos capazes de apresentar níveis de precisão, sensibilidade e especificidade equivalentes aos métodos clássicos, acrescentando-lhes as vantagens de fácil execução, portabilidade e aplicação *point-of-care* (O’Farrell, 2013). Assim, foi com base na demonstração da viabilidade de deteção de anticorpos reativos contra *P. jirovecii* com o uso dos ARS produzidos e com base na necessidade de criação de alternativas de diagnóstico mais rápidas, mais baratas e menos centralizadas em infraestruturas próprias, que surgiu a ideia de se desenvolver um imunoensaio de fluxo lateral para o diagnóstico da PPc (Tomás *et al.*, 2019). Este imunoensaio foi desenvolvido com base na bioconjugação dos ARS de *P. jirovecii* produzidos com AuNP esféricas, previamente funcionalizadas, que operam como transdutoras do sinal de biorreconhecimento dos anticorpos anti-*P. jirovecii* séricos, devido à sua elevada área de superfície, facilidade de bioconjugação e cor intensa

(Baptista *et al.*, 2011). Assim, neste estudo, montaram-se e otimizaram-se dois testes de tira, com vista à detecção de anticorpos IgM reativos contra os ARS da Msg e da Kex1 desenhados, em amostras de soro de doentes com e sem infeção por *P. jirovecii*.

Para o desenvolvimento destes testes, criaram-se bioconjugados AuNP-ARS que foram otimizados como ferramentas de detecção específicas desses anticorpos. Esta foi a abordagem escolhida porque estudos recentes (Sotnikov *et al.*, 2015) demonstraram que, embora menos comuns do que os bioconjugados AuNP-anticorpo, os bioconjugados AuNP-antigénio potenciam a sensibilidade dos ensaios direcionados à pesquisa de anticorpos, pois propiciam uma captura mais direcionada dos anticorpos de interesse na zona analítica (ver figura 13 do capítulo 1 na pág. 70). Adicionalmente, neste estudo utilizaram-se AuNP esféricas de maiores dimensões ( $\approx 40$  nm) do que as que são, por norma, utilizadas no desenvolvimento destes ensaios ( $\approx 15$  a  $20$  nm). Esta escolha deveu-se ao facto de AuNP de maiores dimensões possuírem uma cor vermelha mais intensa, por apresentarem uma extinção molar da sua ressonância plasmónica de superfície superior à de AuNP de menores dimensões (Haiss *et al.*, 2007). Tal, ir-se-á refletir no aumento da sensibilidade destes imunoensaios, através da obtenção de um sinal ótico mais intenso e visível a olho nu, com recurso a menores concentrações de AuNP.

Assim, neste estudo, a otimização dos bioconjugados AuNP-ARS começou com a síntese de nanopartículas com o diâmetro desejado e sua posterior funcionalização com ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA), um alcanotiol que se destaca como um bom precursor de conjugação de base eletrostática de AuNP com proteínas (Gomes *et al.*, 2012; Bolat *et al.*, 2013). De seguida, incubaram-se as AuNP funcionalizadas com cada um dos ARS produzidos para obtenção dos bioconjugados pretendidos. Durante a formação destes bioconjugados, ocorrem alterações da carga superficial e do tamanho das AuNP à medida que maiores quantidades de ARS são adsorvidas à sua superfície, por interações eletrostáticas. Assim, a formação destes bioconjugados foi caracterizada por ensaios de eletroforese em gel de agarose (EGA), através da avaliação da mobilidade eletroforética destes bioconjugados, que deve ser inversamente proporcional à quantidade de proteína que reveste as AuNP. Através da variação da razão molar de ARS adicionada à solução de AuNP, foi possível caracterizar a formação de uma coroa proteica em redor das AuNP, através da verificação da saturação da superfície das AuNP pelo ARS adicionado, caracterizada pela formação de um patamar na mobilidade eletroforética dos

bioconjugados, que se mantêm constante a partir da razão molar ótima para revestimento das AuNP (ver figura 4 do capítulo 3 na pág. 138).

Depois da determinação da razão ARS:AuNP ótima para a produção dos bioconjugados, interessava perceber se estes bioconjugados eram, de facto, capazes de interagir especificamente com anticorpos anti-*P. jirovecii* presentes em soros de doentes infetados por *P. jirovecii*. Para isso, foram feitos ensaios de EGA para caracterização da interação destes bioconjugados com soros de doentes com e sem infeção por *P. jirovecii* na presença e na ausência de um passo de pré-bloqueamento dos bioconjugados AuNP-ARS. Os resultados demonstraram que o passo de pré-bloqueamento favorece a especificidade da reação dos bioconjugados com os anticorpos de interesse (ver figura 5 do capítulo 3 na pág. 139). Isto era expectável, uma vez que este procedimento é comumente utilizado para aumentar a especificidade de imunoenaios (Binder & Isler, 2013). Neste caso, o aumento da especificidade pode ser explicado pelo papel dos agentes de bloqueamento na cobertura de quaisquer locais de ligação remanescentes à superfície das AuNP, que pudessem proporcionar locais de ligação inespecífica à superfície das mesmas.

De seguida, como a caseína demonstrou ser um agente de bloqueamento mais eficiente do que a BSA, bioconjugados AuNP-ARS-caseína foram estudados para comprovar a viabilidade da sua utilização no desenvolvimento de um ensaio de fluxo lateral para diagnóstico da PPc. Os resultados de ensaios com estes bioconjugados demonstraram que, de facto, os bioconjugados AuNP-ARS-caseína são capazes de interagir com anticorpos reativos contra o ARS e que essas interações são específicas, pois existe diminuição da mobilidade eletroforética destes bioconjugados após incubação com soros de doentes com infeção por *P. jirovecii*, mas não existe alteração significativa da sua mobilidade após interação com soros de doentes sem infeção (ver figura 5 do capítulo 3 na pág. 137). Tal pode ser explicado pelo facto de nos soros de doentes sem infeção por *P. jirovecii* não existirem anticorpos reativos contra o ARS, não ocorrendo interação entre os bioconjugados e os soros destes doentes. Estes resultados sugerem ainda que o antigénio da Kex1 parece apresentar maior eficiência na distinção de doentes com e sem a doença do que o ARS da Msg. Isto porque, as diferenças detetadas na migração eletroforética dos bioconjugados AuNP-ARS-caseína após incubação com soros de doentes com e sem infeção, é substancialmente superior (2,5x) na presença do ARS da Kex1 do que na presença do ARS da Msg. Tal sugere que quer os ensaios de fluxo lateral quer os ELISA

serão mais sensíveis e mais específicos aquando da utilização deste novo ARS da Kex1, comparativamente aos ensaios desenvolvidos com o ARS da Msg.

Para ser possível, mais tarde, comprovar esta tendência, foram desenvolvidos dois testes de tira distintos: um com bioconjugados AuNP-Kex1-caseína e outro com bioconjugados AuNP-Msg-caseína. Nestes testes de tira, foram imobilizados anticorpos monoclonais anti-IgM humana na zona de teste e anticorpos policlonais reativos contra o ARS presente nos bioconjugados, na zona controlo. Assim, estes testes foram desenhados para um “teste negativo”, a ausência de anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii* no soro do doente, resultar na ausência de sinal na linha teste, sendo a correta eluição da amostra e dos bioconjugados confirmada através da captura dos bioconjugados AuNP-ARS-caseína na linha controlo, com a formação de uma única linha vermelha nesta região. Num “teste positivo”, os bioconjugados são capazes de reagir com anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii*, presentes em amostras de soro de doentes com infeção por *P. jirovecii*, dando origem a uma linha vermelha na zona teste, além da linha vermelha na zona controlo (ver figura 1 do capítulo 3 na pág. 132). Para a montagem destes testes de tira, todos os componentes do teste foram criteriosamente selecionados e tratados, tendo por base a otimização do sinal ótico obtido nas zonas analíticas do teste. Esta otimização e a avaliação final do desempenho dos testes montados foram realizadas quer por inspeção visual dos resultados, quer por quantificação da intensidade de cor nas zonas analíticas, recorrendo a um *software* de tratamento de imagem.

Neste estudo preliminar de prova de conceito, os testes de tira desenvolvidos foram testados com recurso a dois conjuntos (*pools*) de amostras de soros que representavam uma amostra positiva e uma amostra negativa, uma vez que se pretendia comprovar a eficiência desta abordagem (teste de tira) na distinção de doentes com e sem infeção por *P. jirovecii*. A amostra positiva consistiu numa mistura (n=5) de soros de doentes com infeção por *P. jirovecii*, enquanto a amostra negativa consistiu na mistura (n=5) de soros de doentes sem infeção por *P. jirovecii*. Os resultados obtidos demonstraram que na presença de soros de doentes com infeção por *P. jirovecii*, os testes montados quer com bioconjugados AuNP-Kex1-caseína quer com bioconjugados AuNP-Msg-caseína apresentavam um comportamento concordante com um “teste positivo”, enquanto a aplicação de amostras de soro de doentes sem infeção por *P. jirovecii* resultava na apresentação típica de um “teste negativo” (ver figura 8 do capítulo 3 na pág. 143).



Estes resultados comprovam assim a viabilidade do conceito dos imunoenaios de fluxo lateral em formato de testes de tira produzidos, demonstrando, uma vez mais, que ambos os ARS produzidos funcionam como ferramentas antigénicas na deteção de um biomarcador serológico aplicável no diagnóstico diferencial de PPc ativa: os anticorpos IgM anti-*P. jirovecii*. Contudo, a avaliação do desempenho do ARS da Kex1 comparativamente ao ARS da Msg na pesquisa desses anticorpos não foi possível neste estudo preliminar. Assim, na tentativa de compreender se, de facto, o ARS da Kex1 apresenta maior eficiência na captura destes anticorpos de interesse, surgiu o estudo apresentado no capítulo 4.

O estudo “*Detection of anti-Pneumocystis jirovecii antibodies in human serum using a recombinant synthetic multi-epitope kexin-based antigen*”, apresentado no capítulo 4, descreve o desempenho do teste ELISA desenvolvido e otimizado com o novo ARS da Kex1 para o serodiagnóstico da PPc. Neste estudo, foi possível verificar que a aplicação deste ARS promove, de facto, um melhor desempenho do teste ELISA (sensibilidade de 70,8% e especificidade de 75.0%, ver tabela 1 do capítulo 4 na pág. 153), do que o ARS da Msg (sensibilidade de 68% e especificidade de 61.8%) avaliado no estudo do capítulo 2 (ver tabela 2 do capítulo 2 na pág. 124). Embora a Kex1, ao contrário da Msg, não seja uma proteína de superfície nem proveniente de um gene multi-cópia, ou ainda uma proteína estritamente específica de *P. jirovecii* (Lee et al., 2000; Kutty & Kovacs, 2003), estes resultados vêm corroborar o que os dados dos ensaios de EGA do estudo apresentado no capítulo 3 sugeriam: o ARS da Kex1 contribuí para uma melhoria dos valores de sensibilidade e especificidade do teste serológico. Este fenómeno pode ser explicado por a Kex1 ser uma proteína que não sofre variação antigénica durante a infeção, o que faz com que os epítomos escolhidos para a composição do seu ARS sejam reconhecidos, de forma mais constante do que os epítomos do ARS da Msg, durante a infeção. Apesar do ARS da Msg ter sido desenhado com epítomos provenientes de regiões conservadas dessa proteína, o mesmo pode não ser reconhecido durante alguns períodos da infeção, devido à modificação dos paratopos dos anticorpos reativos contra *P. jirovecii*, fruto da variabilidade genética da Msg deste microrganismo (Stringer & Keely, 2001; Hauser, 2019).

Todos estes resultados vêm assim demonstrar que, apesar de serem necessárias otimizações futuras para a possível validação e consequente aplicação destes testes

serológicos na prática clínica, uma abordagem baseada em ARS de *P. jirovecii* poderá viabilizar uma alternativa de diagnóstico da PPc mais rápida, mais barata, menos invasiva e menos dependente de exames laboratoriais especializados e centralizados em infraestruturas próprias.

### **5.2 Conclusões e perspectivas futuras**

Tendo em conta todos os resultados obtidos, pode concluir-se que os objetivos propostos para este trabalho foram cumpridos.

Foram produzidos e purificados com sucesso dois ARS específicos da Msg e Kex1 de *P. jirovecii*, capazes de funcionar como ferramentas antigénicas em técnicas de ELISA para deteção de anticorpos específicos contra este microrganismo. Os resultados obtidos demonstraram que as IgM anti-*P. jirovecii* são os melhores biomarcadores serológicos a aplicar no diagnóstico da PPc, tendo-se definido títulos de IgM anti-*P. jirovecii* com aplicação no diagnóstico diferencial de doentes com e sem PPc.

As técnicas ELISA desenvolvidas, demonstraram que as abordagens baseadas na aplicação dos ARS na deteção de anticorpos IgM específicos contra o agente infeccioso poderão vir a ter aplicação num diagnóstico menos invasivo da PPc, tendo o ARS da Kex1 apresentado maior aplicação do que o ARS da Msg para esse fim.

Os ARS produzidos foram ainda utilizados com sucesso na obtenção de bioconjugados AuNP-ARS, que se mostraram capazes de interagir especificamente com anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii* presentes nos soros de doentes com infeção por *P. jirovecii*. Assim, foi possível montar dois imunoensaios de fluxo lateral em formato de testes de tira, que mostraram aplicabilidade no diagnóstico rápido, potencialmente sensível e específico da PPc, aliando estas características à possibilidade da sua execução no local de prestação de cuidados de saúde (*point-of-care*).

Em conclusão, os resultados da presente dissertação pretendem contribuir para o encurtamento do tempo que nos separa da implementação clínica de um teste de serodiagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis*, que permita um diagnóstico mais rápido, mais barato e mais descentralizado do que os métodos convencionais. A precocidade do diagnóstico e, portanto, do tratamento aumentarão a duração e a qualidade de vida dos doentes e, ao mesmo tempo, auxiliarão na redução dos custos associados ao diagnóstico e tratamento desta doença.

Em termos de perspetivas futuras, seria interessante aplicar as técnicas ELISA desenvolvidas com ambos os ARS em estudos prospetivos longitudinais, por forma a desenvolver conhecimentos no que respeita à cinética dos anticorpos destes doentes e sua implicação no seguimento e correlação com a progressão da doença. Por outro lado, seria interessante aplicar estas técnicas em estudos de seroprevalência destes anticorpos em diferentes grupos clínicos compostos por doentes imunocomprometidos com diferentes

origens geográficas e diferentes causas de imunossupressão (doentes oncológicos, doentes com patologias autoimunes sujeitos a doses elevadas de agentes imunossupressores, doentes transplantados e doentes infetados por VIH), por forma a comprovar se os títulos de anticorpos com significado no diagnóstico clínico, variam ou não consoante a origem geográfica ou as causas e características de imunossupressão dos doentes.

No que respeita aos ARS produzidos neste estudo, uma vez que outros autores já demonstraram a aplicabilidade de antígenos recombinantes de *P. jirovecii* no desenvolvimento de vacinas preventivas contra este microrganismo (Kling & Norris, 2016; Tesini *et al.*, 2017), um estudo do potencial de imunização destes ARS, pode abrir novas portas nesta área. Por outro lado, uma vez que estes antígenos são multivalentes, possuindo diferentes epítomos específicos de *P. jirovecii*, podem ser também utilizados na produção, em murganhos ou fagos, de anticorpos recombinantes que possam viabilizar a deteção direta deste microrganismo (por exemplo por técnicas de imunofluorescência,) em amostras respiratórias obtidas de forma menos invasiva, como a expetoração espontânea ou a saliva.

No que respeita aos bioconjugados AuNP-ARS aqui obtidos, estudos futuros devem incidir numa caracterização mais aprofundada dos mesmos, por tecnologias de microscopia eletrónica e/ou tecnologias de espectroscopia, e em ensaios da estabilidade, com vista à otimização do seu desempenho na deteção específica de anticorpos anti-*P. jirovecii* em imunoensaios de fluxo lateral. Adicionalmente, devem estudar-se processos de conjugação destes ARS com AuNP com diferentes morfologias e tamanhos, com vista à otimização das suas propriedades óticas e, consequentemente, dos sinais óticos obtidos. Quanto aos imunoensaios de fluxo lateral desenvolvidos neste estudo, deverão seguir-se estudos que visem a otimização destes testes e, posteriormente, a validação da sua aplicação no diagnóstico da PPc, com amostras populacionais adequadas. Estes estudos devem ser feitos em testes de tira contendo bioconjugados com ambos os ARS, quer em simultâneo, quer individualmente, por forma a se averiguar a eficiência conjunta e individual de cada um dos bioconjugados produzidos, na deteção de anticorpos específicos anti-*P. jirovecii*. Caso se verifique uma vantagem diagnóstica com a utilização de ambos os bioconjugados em simultâneo, deve avançar-se para a otimização destes testes em formato multiplex, para que seja possível a deteção simultânea de

reatividade contra ambos os antigénios, num único teste de tira, conforme já sugerido por outros autores (Zhu *et al.*, 2013). Adicionalmente, através da demonstração de que é possível fazer quantificação da intensidade de cor nas zonas analíticas dos testes produzidos, este trabalho deixa em aberto a possibilidade de se transformar estes testes qualitativos em testes semi-quantitativos. A sua aplicação na distinção de diferentes grupos clínicos, como por exemplo na distinção de doentes com PPc ativa de doentes colonizados por *P. jirovecii* (sem sintomatologia), deveria ser averiguada. Por fim, estudos futuros podem ainda incidir na otimização deste tipo de testes tornando-os exequíveis em amostras de sangue total (sangue capilar, por exemplo) e não apenas em amostras de soro como aqui demonstrado, o que iria aumentar ainda mais a portabilidade destes testes, tornando-os completamente independentes de qualquer outro instrumento ou infraestrutura.

### 5.3 Referências

ARMSTRONG, J. D., MEINTJES, G., & BROWN, G. D. (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in microbiology*. 22(3). p. 120-127.

BAPTISTA, P. V., DORIA, G., QUARESMA, P., CAVADAS, M., NEVES, C. S., GOMES, I., EATON, P., PEREIRA, E., & FRANCO, R. (2011). Nanoparticles in molecular diagnostics. In: Villaverde, A. (ed.) *Progress in molecular biology and translational science*. Volume 104, p(427-488). Academic Press.

BIENVENU, A.L.; TRAORE, K.; PLEKHANOVA, I.; BOUCHRIK, M.; BOSSARD, C.; & PICOT, S. (2016) *Pneumocystis pneumonia* suspected cases in 604 non-HIV and HIV patients. *International Journal of Infectious Diseases*. 46. p. 11–17.

BINDER, S. & ISLER, J. A. (2013). Detection of Antibodies Relevant to Infectious Disease In: Wild, D. (ed.) *The Immunoassay Handbook*, fourth edition. p (149-155). Oxford, UK: Elsevier Ltd.

BISHOP, L.R. & KOVACS, J.A. (2003) Quantitation of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in healthy persons and immunocompromised patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 187. p. 1844-1848.

BLOUNT, R.J., JARLSBERG, L.G., DALY, K.R., WORODRIA, W., DAVIS, J.L., CATTAMANCHI, A., DJAWE, K., ANDAMA, A., KOCH, J., WALZER, P.D. & HUANG, L. (2012) Serologic responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein among Uganda patients with respiratory symptoms. *PLoS One*. 7 (12).

BOLAT, G., KURALAY, F., EROGLU, G. & ABACI, S. (2013) Fabrication of a polyaniline ultramicroelectrode via a self assembled monolayer modified gold electrode. *Sensors (Basel)*. 13. p. 8079–8094.

BONGOMIN, F., GAGO, S., OLADELE, R., & DENNING, D. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of fungi*. 3(4). p. 57.

BROWN, G. D., DENNING, D. W., GOW, N. A., LEVITZ, S. M., NETEA, M. G., & WHITE, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*. 4(165). 165rv13-165rv13.

DAI, J. F., JIANG, M., QU, L. L., SUN, L., WANG, Y. Y., GONG, L. L., GONG, R. J., & SI, J. (2013). *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant multi-epitope peptide for distinguishing recent from past infection in human sera. *Experimental parasitology*. 133(1). p. 95-100.

DAI, J., JIANG, M., WANG, Y., QU, L. & SI, J. (2012) Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical and vaccine immunology*. 19 (3). p. 338-342.

DALY, R.K., FICHTENBAUM, C.J., TANAKA, R., LINKE, M.J., O'BERT, R. THULLEN, M.S., HUI, M.S., SMULLIAN, A.G. & WALZER, P.D. (2002) Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jiroveci* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons. *The journal of infectious diseases*. 186 (5). p. 644-651.

DALY, R.K., KOCH, J., LEVIN, L. & WALZER, P.D. (2004) Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jiroveci*. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (5). p. 848-854.

DALY, R.K., KOCH, J., RESPALDIZA, N., de la HORRA, C., MONTES-CANO, M.A., VARELA, J.M., CALDERON, E.J. & WALZER, P.D. (2009) Geographical variation in serological responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein antigens. *Clinical microbiology and infection*. 15 (10). p. 937-942.

DALY, R.K., KOCH, J.V., SHIRE, N.J., LEVIN, L. & WALZER, P.D. (2006) Human immunodeficiency virus-infected patients with prior *Pneumocystis pneumonia* exhibit increased serologic reactivity to several major surface glycoprotein clones. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13 (10). p. 1071-1078.

DJAWE, K., DALY, K.R., LEVIN, L., ZAR, H.J. & WALZER, P.D. (2013) Humoral immune responses to *Pneumocystis jirovecii* antigens in HIV-infected and uninfected young children with *Pneumocystis Pneumocia*. *PLoS One*. 8 (12).

DJAWE, K., HUANG, L., DALY, K.R., LEVIN, L., KOCH, J., SCHWARTZMAN, A., FONG, S., ROTH, B., SUBRAMANIAN, A., GRIECO, K., JARLSBERG, L. &

WALZER, P.D. (2010) Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. *PLoS One*. 5 (12).

ESTEVEES, F., CALÉ, S. S., BADURA, R., DE BOER, M. G., MALTEZ, F., CALDERON, E. J., VAN DER REIJDEN, T. J., MÁRQUEZ-MARTÍN, E., ANTUNES, F., & MATOS, O. (2015). Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers. *Clinical Microbiology and Infection*. 21(4). 379-e1.

FINKELMAN, M. A. (2010). *Pneumocystis jirovecii* infection: Cell wall (1→3)-β-D-glucan biology and diagnostic utility. *Critical reviews in microbiology*. 36(4). p. 271-281.

GINGO, M.R., LUCHT, L., DALY, K.R., DJAWE, K., PALELLA, F.J., ABRAHAM, A.G., BREAN, J.H., WITT, M.D., KINGSLEY, L.A., NORRIS, K.A., WALZER, P.D. & MORRIS, A. (2011) Serologic responses to *Pneumocystis* proteins in human immunodeficiency virus patients with and without *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 57 (3). p. 190-196.

GLOBAL ACTION FUND FOR FUNGAL INFECTIONS (GAFFI). Priority Fungal Infections. [Online]. Disponível em: <http://www.gaffi.org/media/fact-sheets/>. [Acedido em 13 Junho 2019].

GOMES, I. FEIO, M. J., SANTOS, N. C., EATON, P., SERRO, A. P., SARAMAGO, B., PEREIRA, E., & FRANCO, R. (2012) Controlled adsorption of cytochrome c to nanostructured gold surfaces. *Journal of Nanoparticle Research*. 14. p. 1–12.

HAISS, W., THANH, N. T. K., AVEYARD, J., & FERNIG, D. G. (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–Vis spectra. *Analytical chemistry*. 79(11). p. 4215-4221.

HAUSER, P. M. (2019). Is the unique camouflage strategy of *Pneumocystis* associated with its particular niche within host lungs? *PLoS pathogens*. 15(1). e1007480.

KIERNY, M. R., CUNNINGHAM, T. D., & KAY, B. K. (2012). Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. *Nano reviews*. 3(1). p. 17240.



- KIM, S. J., LEE, J., CHO, Y. J., PARK, Y. S., LEE, C. H., YOON, H. I., LEE, S. M., YIM, J. J., LEE, J. H., YOO, C. G., LEE, C. T., KIM, Y., W., HAN, S. K., KIM, H. B. & PARK, J. S. (2014). Prognostic factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients without HIV infection. *Journal of infection*. 69(1). p. 88-95.
- KLING, H. M., & NORRIS, K. A. (2016). Vaccine-induced immunogenicity and protection against *Pneumocystis* pneumonia in a nonhuman primate model of HIV and *Pneumocystis* coinfection. *The Journal of infectious diseases*. 213(10). p. 1586-1595.
- KUTTY, G., & KOVACS, J. A. (2003). A single-copy gene encodes Kex1, a serine endoprotease of *Pneumocystis jirovecii*. *Infection and immunity*. 71(1). p. 571-574.
- LEE, L. H., GIGLIOTTI, F., WRIGHT, T. W., SIMPSON-HAIDARIS, P. J., WEINBERG, G. A., HAIDARIS, C. G. (2000) Molecular characterization of KEX1, a kexin-like protease in mouse *Pneumocystis carinii*. *Gene* 242. p. 141–150.
- MA, L., CHEN, Z., HUANG, D. W., KUTTY, G., ISHIHARA, M., WANG, H., ABOUELLEIL, A., BISHOP, L., DAVEY, E., DENG, R., DENG, X., FAN, L., FANTONI, G., FITZGERALD, M., GOGINENI, E., GOLDBERG, J. M., HANDLEY, G., HU, X., HUBER, C., JIAO, X., JONES, K., LEVIN, J. Z., LIU, Y., MACDONALD, P., MELNIKOV, A., RALEY, C., SASSI, M., SHERMAN, BT., SONG, X., SYKES, S., TRAN, B., WALSH, L., XIA, Y., YANG, J., YOUNG, S., ZENG, Q., ZHENG, X., STEPHENS, R., NUSBAUM, C., BIRREN, BW., AZADI, P., LEMPICKI, R. A., CUOMO, C.A., & KOVACS, J.A. (2016). Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nature communications*. 7. 10740.
- MAINI, R., HENDERSON, K.L., SHERIDAN, E.A., LAMAGNI, T., NICHOLS, G., DELPECH, V., PHIN, N. (2013) Increasing *Pneumocystis* pneumonia, England, UK, 2000–2010. *Emerging infectious diseases*. 19. p. 386–392.
- MATOS, O., TOMÁS, A. L., & ANTUNES, F. (2017). *Pneumocystis jirovecii* and PcP. In: Montes, H. M. M. & Lopes-Bezerra, L. M. (eds) Current Progress in Medical Mycology, p(215-254). Switzerland: Springer International Publishing
- MONNET, X.; VIDAL-PETIOT, E.; OSMAN, D.; HAMZAOU, O.; DURRBACH, A.; GOUJARD, C.; MICELI, C.; BOURÉE, P.; & RICHARD, C. (2008) Critical care

management and outcome of severe *Pneumocystis* pneumonia in patients with and without HIV infection. *Critical Care*. 12. R28

O'FARRELL, B. (2013). Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays In: Wild, D. (ed.) *The Immunoassay Handbook*, fourth edition. p(89-108). Oxford, UK: Elsevier Ltd.

RAPAKA, R. R., RICKS, D. M., ALCORN, J. F., CHEN, K., KHADER, S.A., ZHENG, M., PLEVY, S., BENGTÉN, E., KOLLS, J. K. (2010) Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*. *The Journal of Experimental Medicine*. 207(20). p. 2907-19.

RODRIGUEZ, M. & FISHMAN, J.A (2004) Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*. 17. p. 770–782.

SOTNIKOV, D.V., ZHERDEV, A.V., AVDIENKO, V.G., & DZANTIEV, B.B. (2015) Immunochromatographic assay for serodiagnosis of tuberculosis using an antigen-colloidal gold conjugate. *Applied biochemistry and microbiology*. 51. p. 834–839.

STRINGER, J.R. & KEELY, S.P. (2001) Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infection and immunity*. 69 (2). p. 627-639.

TASAKA S., HASEGAWA N., KOBAYASHI S., YAMADA, W., NISHIMURA, T., TAKEUCHI, T. & ISHIZAKA, A. (2007) Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest*. 131 (4). p. 1173–1180.

TESINI, B. L., WRIGHT, T. W., MALONE, J. E., HAIDARIS, C. G., HARBER, M., SANT, A. J., NAYAK, J. L., & GIGLIOTTI, F. (2017). Immunization with *Pneumocystis* cross-reactive antigen 1 (Pca1) protects mice against *Pneumocystis* pneumonia and generates antibody to *Pneumocystis jirovecii*. *Infection and immunity*. 85(4). e00850-16.

TIPIRNENI, R., DALY, K.R., JARLSBERG, L.G., KOCH, J.V., SWARTZMAN, A., ROTH, B.M., WALZER, P.D. & HUANG, L. (2009) Healthcare worker occupation and

immune response to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging Infectious Diseases*. 15 (10) p. 1590-1597.

TOMÁS, A.L., CARDOSO, F., ESTEVES, F. & MATOS, O (2016) Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Scientific Reports*. 6:36287.

TOMÁS, A. L., DE ALMEIDA, M. P., CARDOSO, F., PINTO, M., PEREIRA, E., FRANCO, R. & MATOS, O. (2019) Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10:2917. doi: 10.3389/fmicb.2019.02917

TOMÁS, A. L., & MATOS, O. (2018) Current Advances in Laboratory Diagnosis. *OBM Genetics* 2(4).

WALZER, P.D., DJAWE, K., LEVIN, L., DALY, K.R., KOCH, J., KINGSLEY, L., WITT, M., GOLUB, E.T., BREM, J.H., TAIWO, B. & MORRIS, A. (2009) Long-term serologic responses to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in HIV-positive individuals with and without *P. jirovecii* infection. *Journal of Infectious Diseases*. 199 (9). p. 1335-1344.

ZHU, J., ZOU, N., MAO, H., WANG, P., ZHU, D., JI, H., CONG, H., SUN, C., WANG, H., ZHANG, F., QIAN, J., JIN, Q., ZHAO, J. (2013). Evaluation of a modified lateral flow immunoassay for detection of high-sensitivity cardiac troponin I and myoglobin. *Biosensors and Bioelectronics*. 42. p. 522-525.



## **Anexos**



## Anexo I

**Material suplementar do artigo apresentado no capítulo 2 desta dissertação:**

**TOMÁS, A. L., CARDOSO, F., ESTEVES, F. & MATOS, O (2016)** Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Scientific Reports*. 6:36287.

### Supplementary information

#### **Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*.**

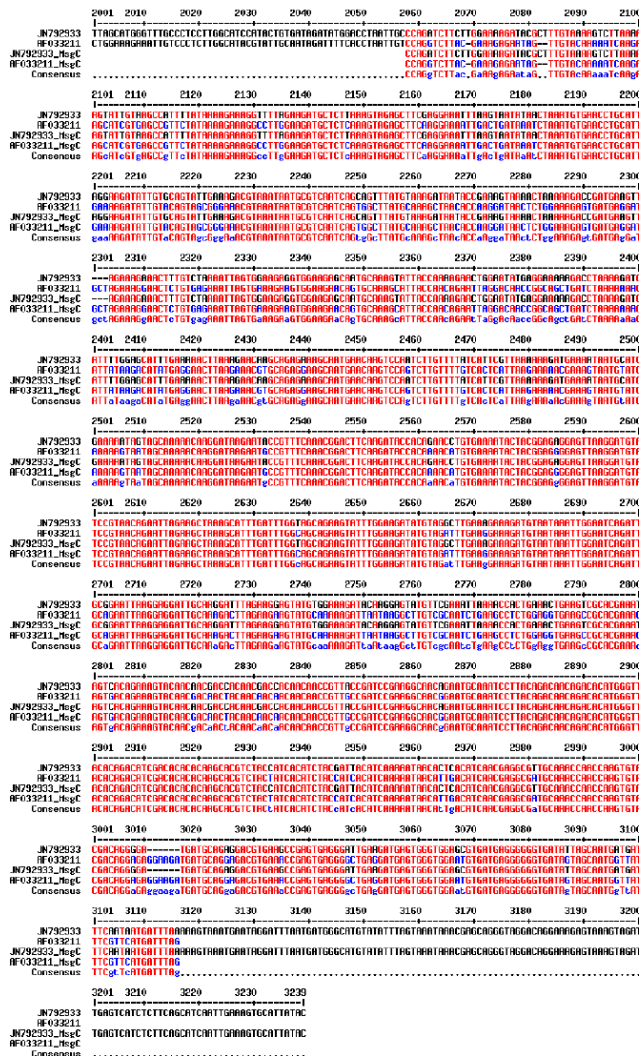
Tomás AL<sup>1</sup>, Cardoso F<sup>1</sup>, Esteves F<sup>2</sup> and Matos O<sup>1\*</sup>;

<sup>1</sup> Unidade de Parasitologia Médica, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Global Health and Tropical Medicine, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup> Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana (ToxOmics), Departamento de Genética, NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

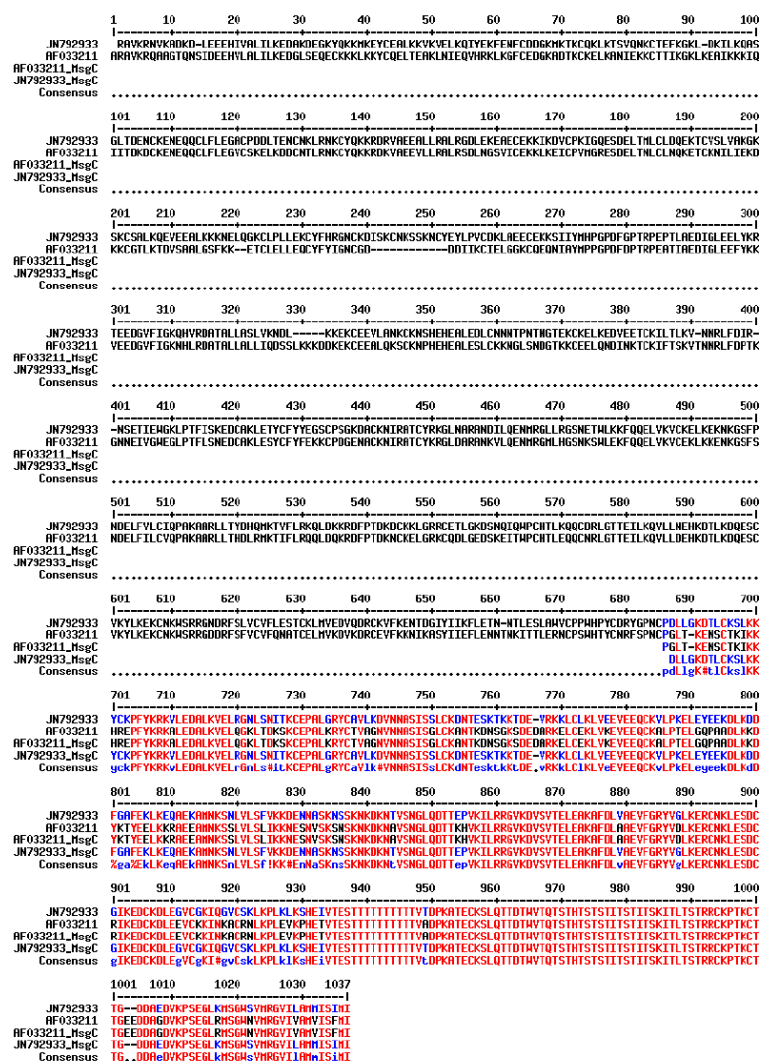
\* Electronic address: [omatos@ihmt.unl.pt](mailto:omatos@ihmt.unl.pt).

## Figures

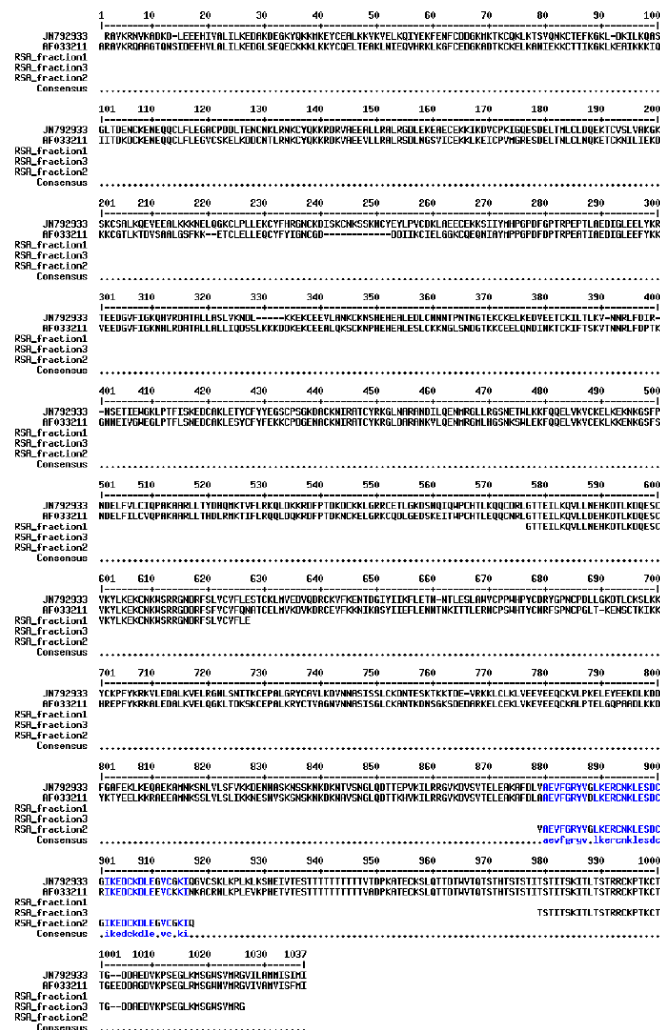


**Supplementary figure S1.** Alignment of the nucleotide sequence of the MsgC portion from GenBank AF033211 and JN792933.1. This alignment allows to locate the nucleotides corresponding to the MsgC portion in the sequence selected for the design of the RSA (JN792933.1) (Multalin version 5.4.1).

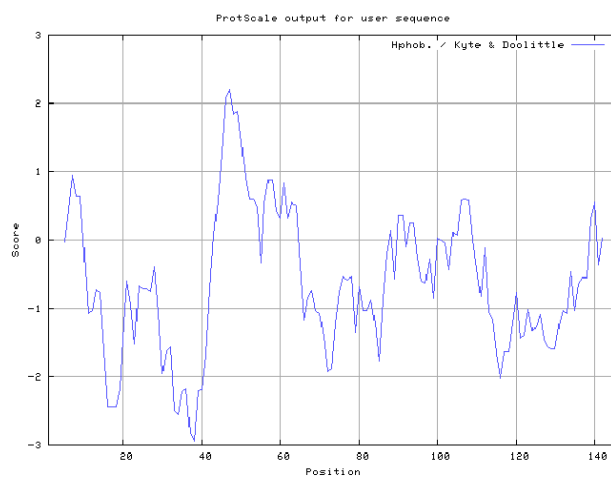




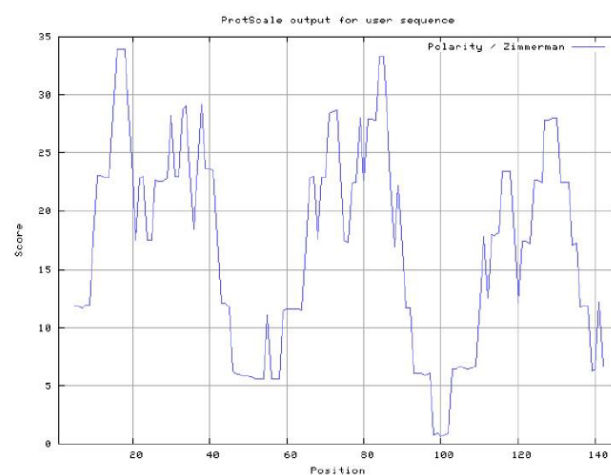
Supplementary figure S2. Alignment of the amino acid sequences of the MsgC from GenBank AF033211 and JN792933.1. This alignment allows the discrimination of the most conserved regions (Multalin version 5.4.1).



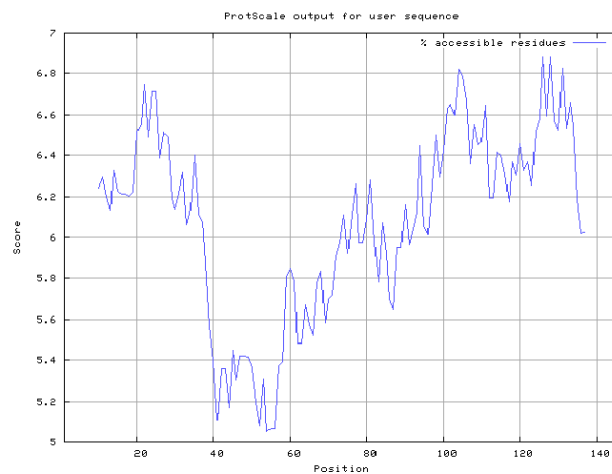
**Supplementary figure S3.** Alignment of the amino acid sequences of the Msg from GenBank AF033211 and JN792933.1 and the three amino acid sequences of the regions selected to produce the final Msg RSA. This alignment shows that the Msg selected regions (region1: 126-176 aa; region 2: 426-464 aa; region 3: 526-571 aa) are located at relative conserved regions (Multalin version 5.4.1).



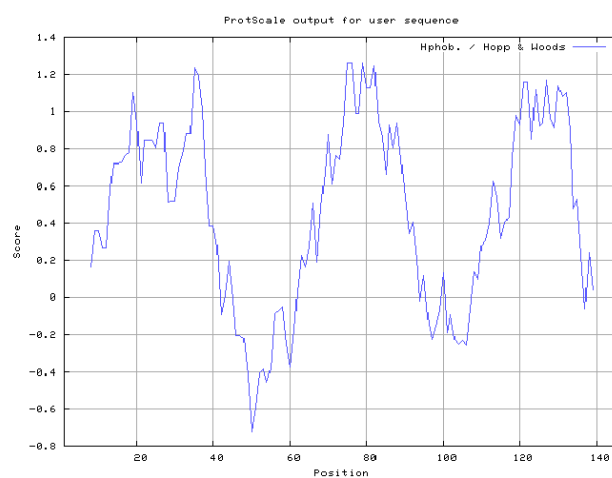
**Supplementary figure S4.** Representation of hydrophilic behaviour of the RSA designed according to Kyle & Doolittle hydropathic scale. The majority of the amino acid sequence of the RSA have a hydrophobic profile, as was intended (ExpASy – ProtScale).



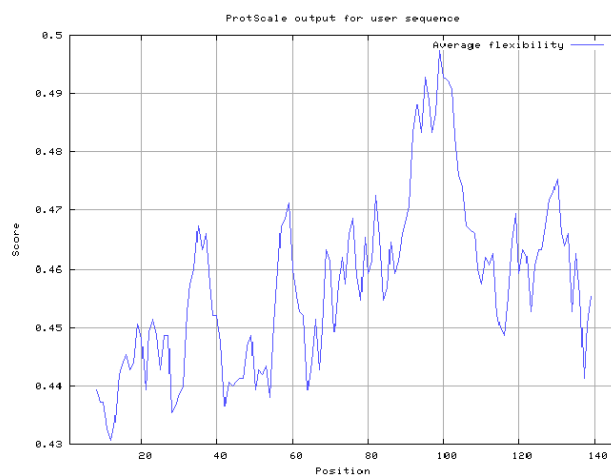
**Supplementary figure S5.** Representation of polarity of the RSA designed according to Zimmerman scale. The majority of the amino acid sequence of the RSA have a polar profile, as was intended (ExPASy – ProtScale).



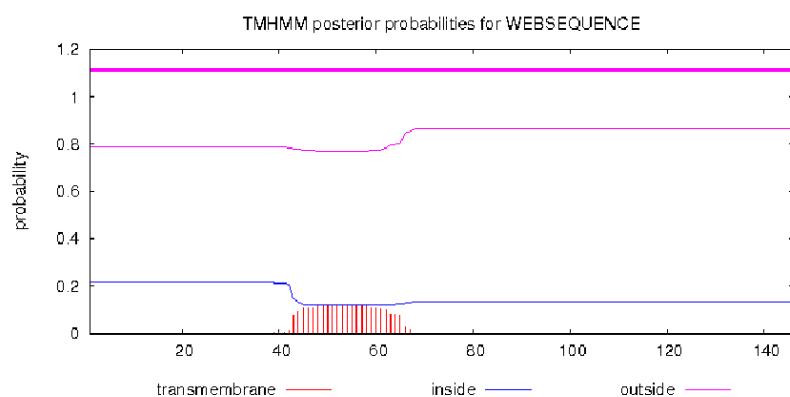
**Supplementary figure S6.** Representation of accessibility of the residues of the RSA designed. All the amino acid sequence of the RSA have an accessible profile, as was intended (ExPASy – ProtScale).



**Supplementary figure S7.** Representation of antigenicity profile of the RSA designed according to Hopp & Woods scale. The residues of the three epitopes selected have an antigenic profile while the glycine bridges have a less antigenic behaviour, as was intended (ExPASy – ProtScale).



**Supplementary figure S8.** Representation of the average flexibility profile of the residues of the RSA designed. The residues have a positive average flexibility, as was intended (ExPASy – ProtScale).



**Supplementary figure S9.** Representation of the putative position on the cytoplasmic membrane of the amino acids present in the RSA designed, through *CBS – TMHMM –* version 2.0 software. This figure pointed to a probability close to one for an external exposure over the whole region under consideration.



**Tables****Supplementary table S1.** GOR IV secondary structure prediction of the RSA (NPS@: Network Protein Sequence Analysis).

Structure	Percentage
<b>Alpha helix</b>	13.70%
<b>Extended strand</b>	27,40%
<b>Random coil</b>	58,90%



## Anexo II

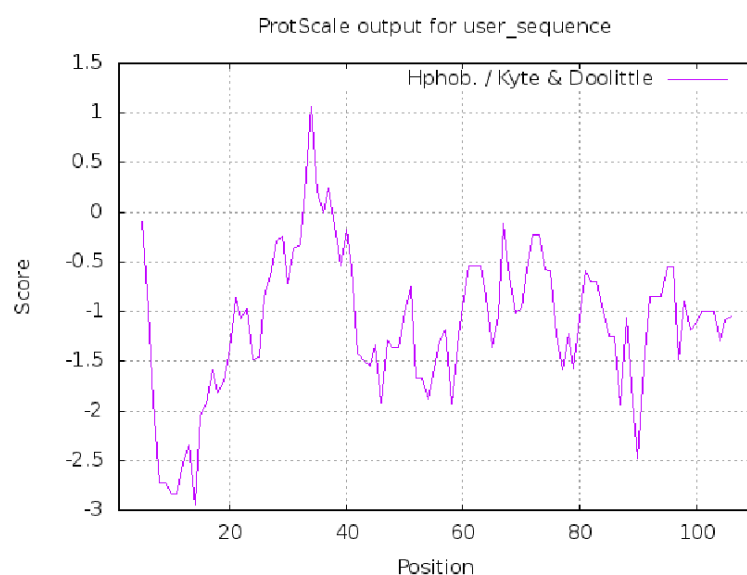
**Material suplementar do artigo apresentado no capítulo 3 desta dissertação:**

**TOMÁS, A. L., DE ALMEIDA, M. P., CARDOSO, F., PINTO, M., PEREIRA, E., FRANCO, R. & MATOS, O. (2019)** Development of a Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Immunoassay for *Pneumocystis* Pneumonia Serological Diagnosis at Point-of-Care. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10:2917. doi: 10.3389/fmicb.2019.02917.

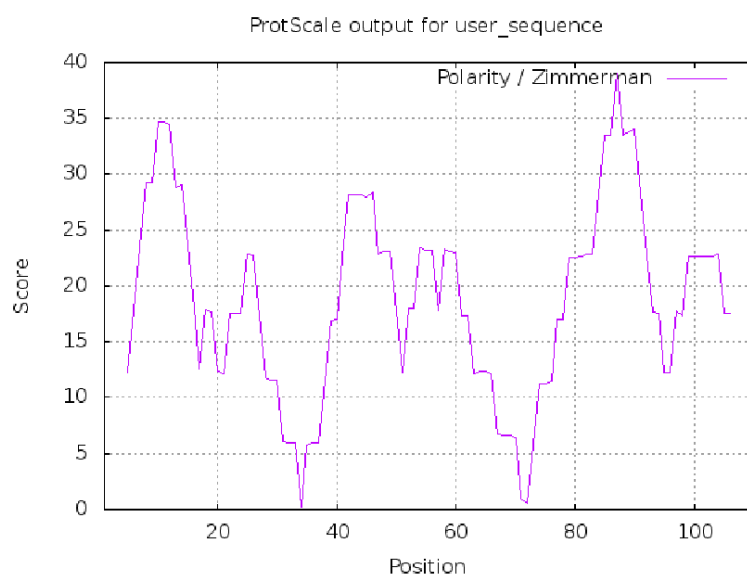


### Supplementary Material

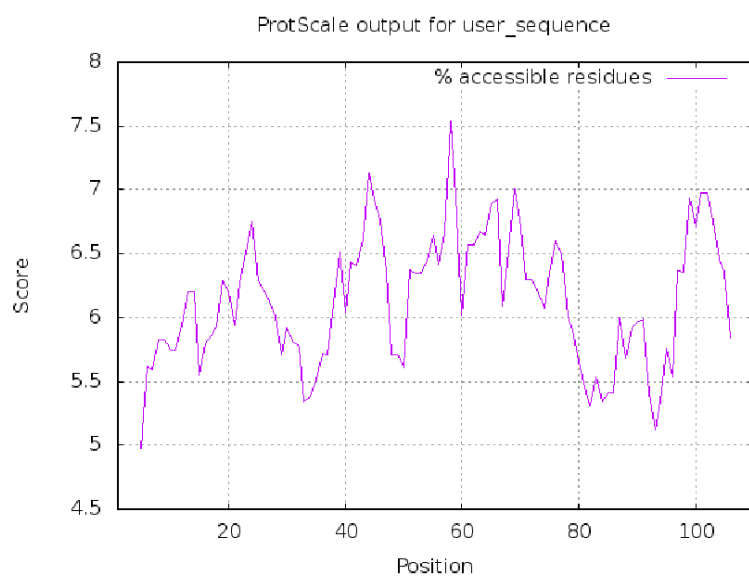
#### Supplementary Figures



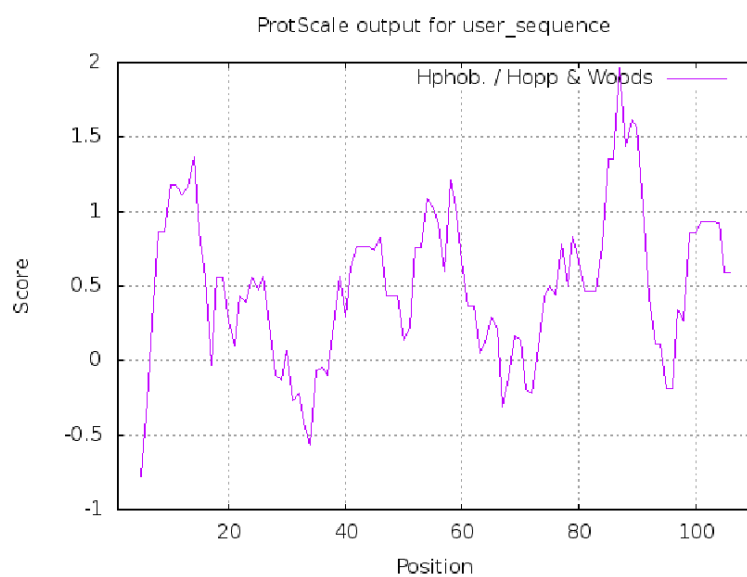
**Supplementary Figure 1.** Representation of hydrophilic behaviour of the Kex1 RSA according to Kyle & Doolittle hydropathic scale. The majority of the amino acid sequence of the RSA have a hydrophobic profile (score < 0), as was intended (ExPASy – ProtScale).



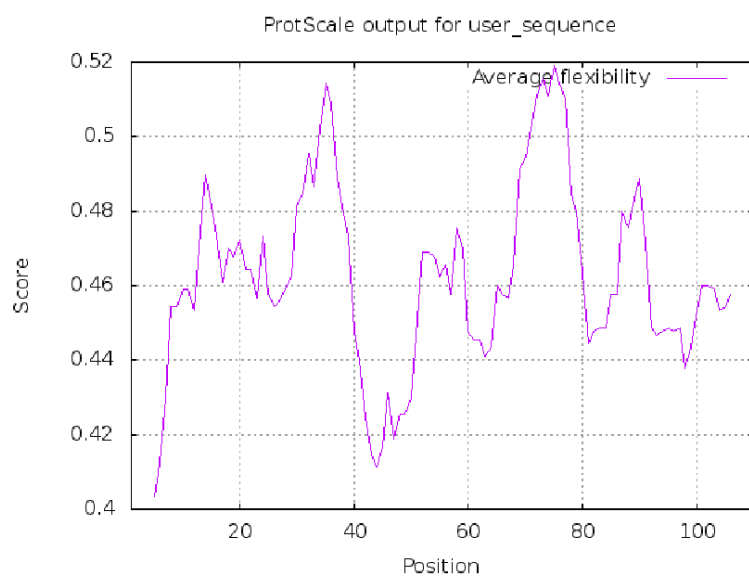
**Supplementary Figure 2.** Representation of polarity of the Kex1 RSA according to Zimmerman scale. The majority of the amino acid sequence of the RSA have a polar profile, as was intended (ExPASy – ProtScale).



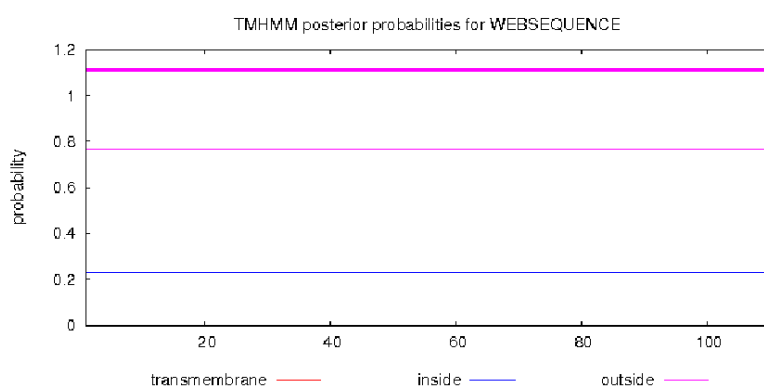
**Supplementary Figure 3.** Representation of accessibility of the residues of the Kex1 RSA. All the amino acid sequence of the RSA have an accessible profile, as was intended (ExPASy – ProtScale).



**Supplementary Figure 4.** Representation of antigenicity profile of the Kex1 RSA according to Hopp & Woods scale. The residues of the three epitopes selected have an antigenic profile while the glycine bridges have a less antigenic behaviour, as was intended (ExPASy – ProtScale).

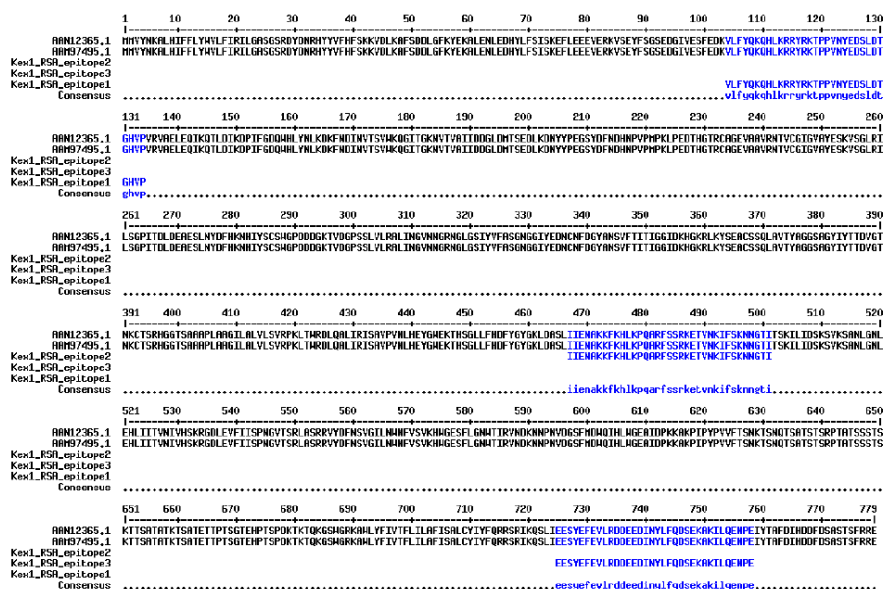


**Supplementary Figure 5.** Representation of the average flexibility profile of the residues of the Kex1 RSA. The residues have a positive average flexibility, as was intended (ExPASy – ProtScale).

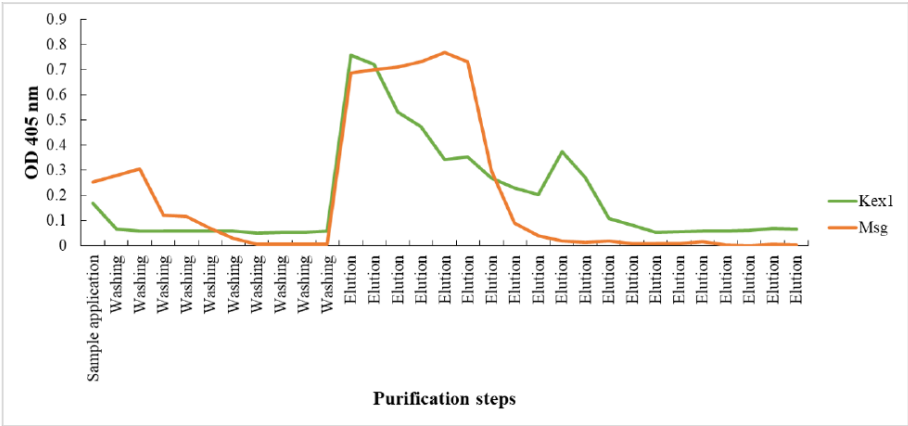


**Supplementary Figure 6.** Representation of the putative position on the cytoplasmic membrane of the amino acids present in the Kex1 RSA, through CBS – TMHMM – version 2.0 software. This figure pointed to a probability close to one for an external exposure over the whole region under consideration.

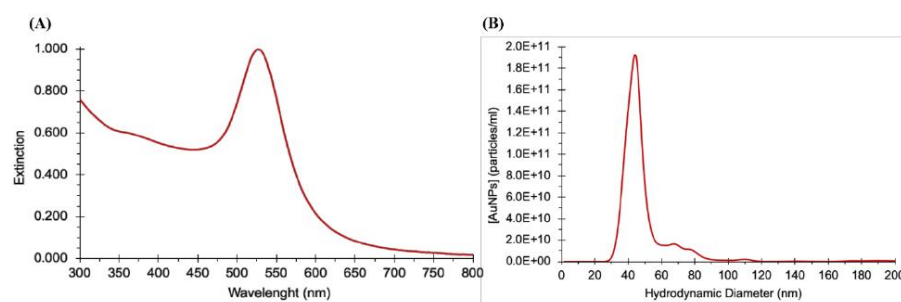




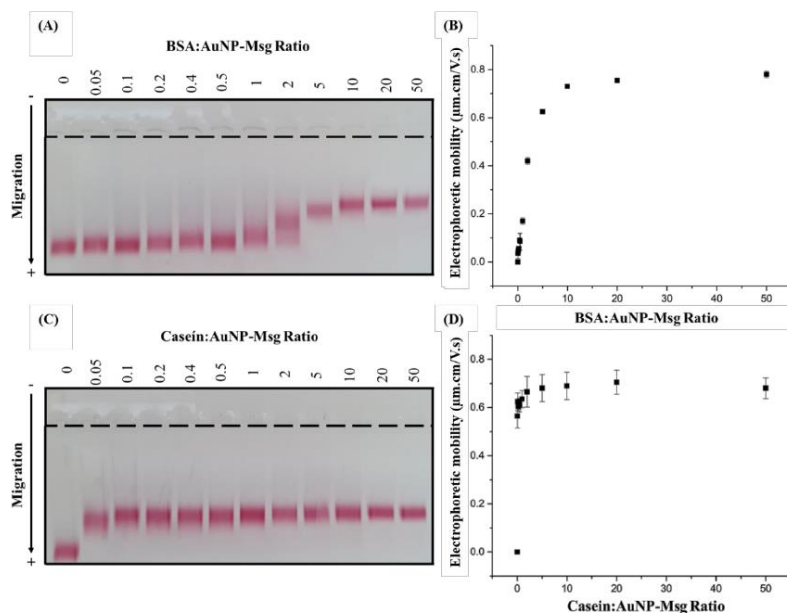
**Supplementary Figure 7.** Alignment of the amino acid sequences of the Kex1 protein from GenBank AAN12365.1 and AAM97495.1 and the three amino acid sequences of the regions selected to produce the final Kex1 RSA. This alignment shows that the Kex1 selected regions (region1: 104-134 aa; region 2: 467-501 aa; region 3: 725-758 aa) are located at conserved regions (Multalin version 5.4.1).



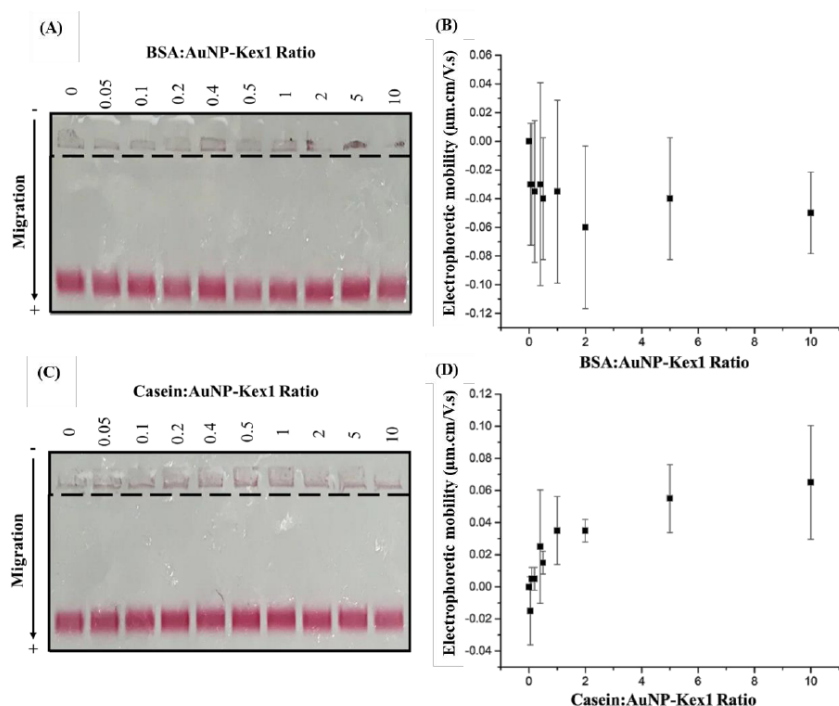
**Supplementary Figure 8.** Representation of indirect ELISA using anti-polyhistidine antibodies measurements (OD 405nm), throughout the purification process of Msg (orange) and Kex1 (green) RSA. Each purification step corresponds to 1 mL volume of sample, washing buffer and elution buffer, respectively.



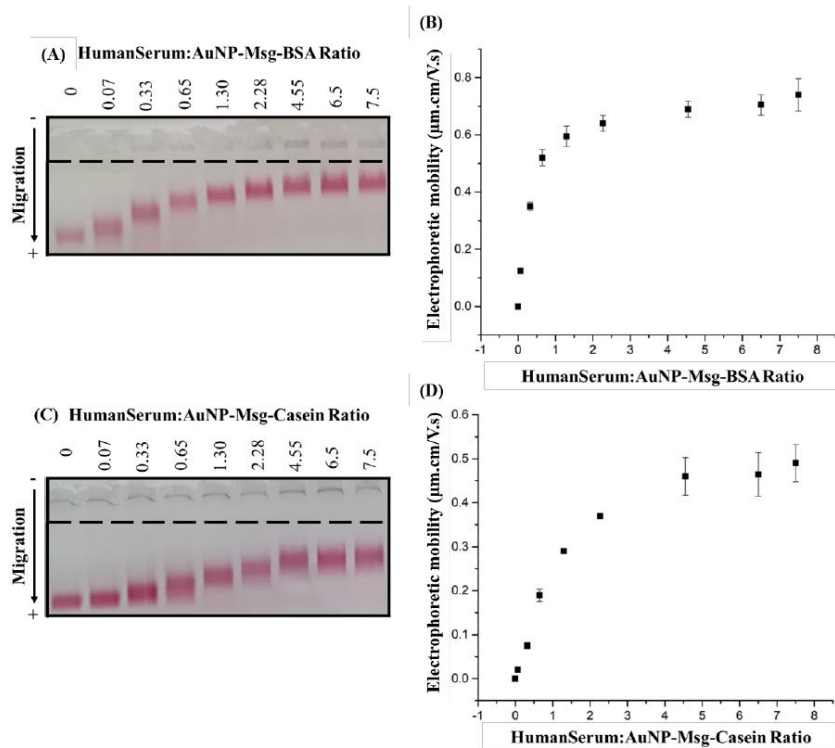
**Supplementary Figure 9.** AuNPs characterization through UV-Vis and NTA. **(A)** Visible spectrum of AuNPs functionalized with 11-MUA. **(B)** Hydrodynamic diameter distribution of the same functionalized AuNPs, obtained by nanoparticle tracking analysis.



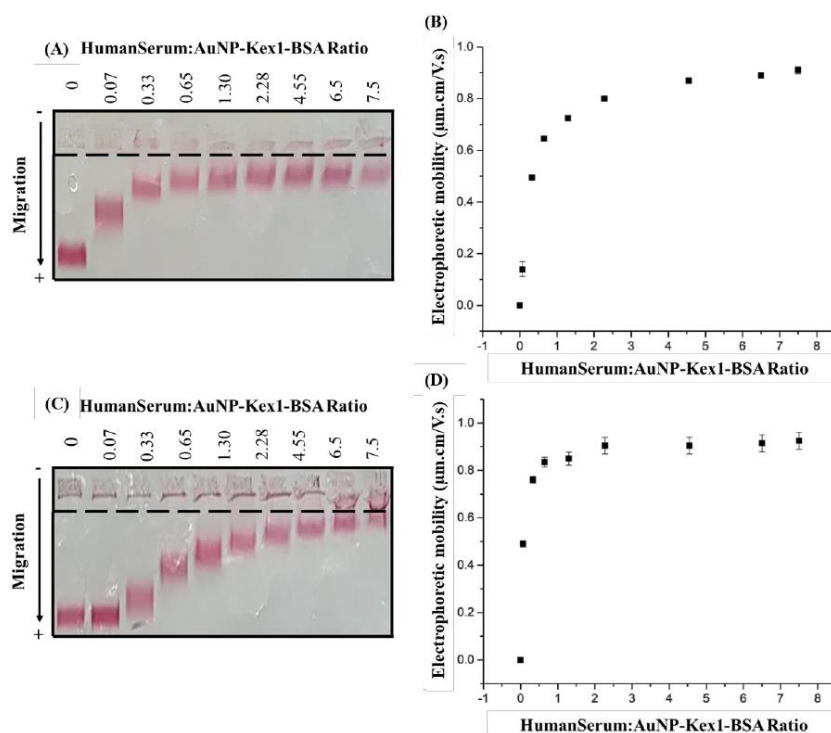
**Supplementary Figure 10.** AuNP-Msg-BSA and AuNP-Msg-Casein conjugates formation. Agarose gel electrophoresis at increasing ratios of BSA to AuNP-Msg (A) and Casein to AuNP-Msg (C), showing the migration of each conjugate bands towards the positive electrode. Differences between the electrophoretic mobility of the AuNP-Msg conjugates and AuNP-Msg-BSA (B) or AuNP-Msg-Casein (D) conjugates at increasing ratios, calculated from the migration distances in gel. The eleven increased ratios (0.05 to 50) correspond to eleven increased protein concentration in nM: 11.7, 23.4, 46.9, 93.8, 117.2, 234.4, 468.8, 1172.1, 2344.2, 4688.4, 11720.9.



**Supplementary Figure 11.** AuNP-Kex1-BSA and AuNP-Kex1-Casein conjugates formation. Agarose gel electrophoresis at increasing ratios of BSA to AuNP-Kex1 (A) and Casein to AuNP-Kex1 (C), showing the migration of each conjugate bands towards the positive electrode. Differences between the electrophoretic mobility of the AuNP-Kex1 conjugates and AuNP-Kex1-BSA (B) or AuNP-Kex1-Casein (D) conjugates at increasing ratios, calculated from the migration distances in gel. The nine increased ratios (0.05 to 50) correspond to nine increased protein concentration in nM: 11.7, 23.4, 46.9, 93.8, 117.2, 234.4, 468.8, 1172.1, 2344.2.

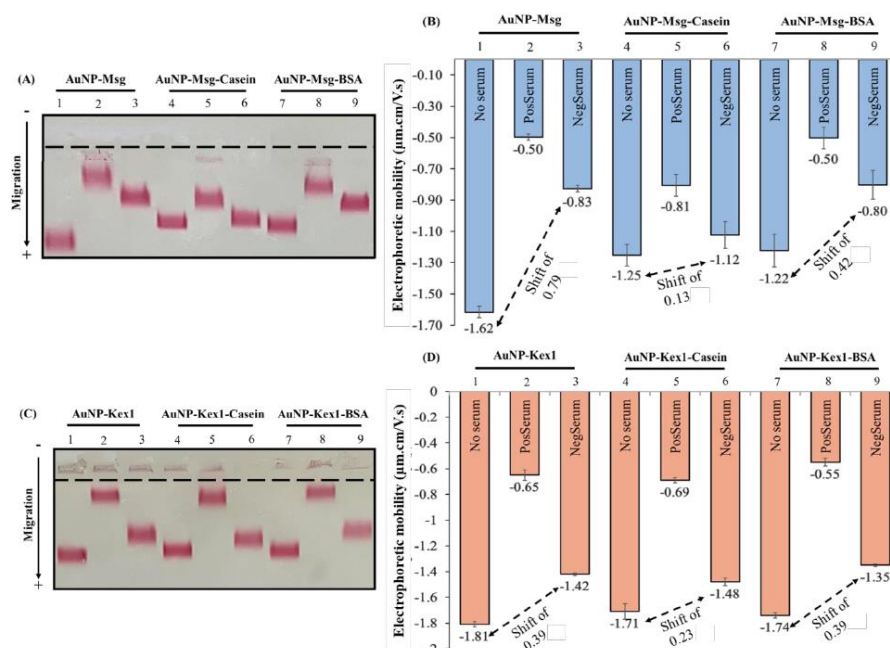


**Supplementary Figure 12.** AuNP-Msg-BSA-HumanSerum and AuNP-Msg-Casein-HumanSerum conjugates formation. Agarose gel electrophoresis at increasing ratios of human serum to AuNP-Msg-BSA (A) and AuNP-Msg-Casein (C), showing the migration of each conjugate bands towards the positive electrode. Differences between the electrophoretic mobility of the blocked conjugates and AuNP-Msg-BSA-HumanSerum (B) or AuNP-Msg-Casein-HumanSerum (D) at increasing ratios, calculated from the migration distances in gel. The eight increased ratios (0.07 to 7.5) correspond to eight increased serum concentration in nM: 15.2, 76.2, 152.4, 304.7, 533.3, 1066.6, 1523.7, 1758.1.



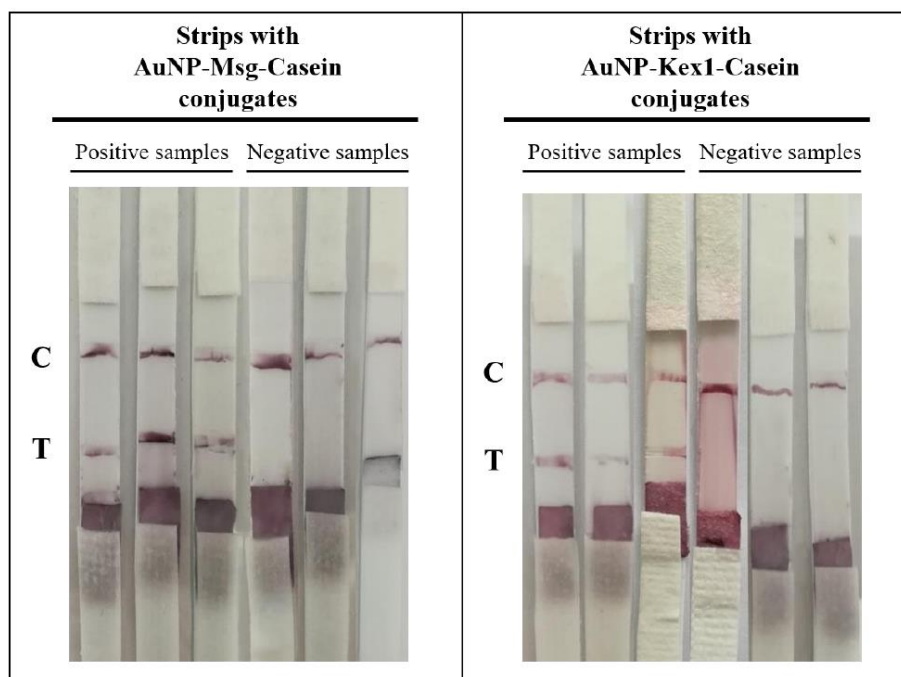
**Supplementary Figure 13.** AuNP-Kex1-BSA-HumanSerum and AuNP-Kex1-Casein-HumanSerum conjugates formation. Agarose gel electrophoresis at increasing ratios of human serum to AuNP-Kex1-BSA (A) and AuNP-Kex1-Casein (C), showing the migration of each conjugate bands towards the positive electrode. Differences between the electrophoretic mobility of the blocked conjugates and AuNP-Kex1-BSA-HumanSerum (B) or AuNP-Kex1-Casein-HumanSerum (D) at increasing ratios, calculated from the migration distances in gel. The eight increased ratios (0.07 to 7.5) correspond to eight increased serum concentration in nM: 15.2, 76.2, 152.4, 304.7, 533.3, 1066.6, 1523.7, 1758.1.

Supplementary Material



**Supplementary Figure 14.** Interaction of blocked and unblocked AuNP-Msg (**A, B**) and AuNP-Kex1 (**C, D**) conjugates with sera pools from patients with and without *P. jirovecii* infection. (**A, C**) Agarose gel electrophoresis of unblocked AuNP-RSA conjugates (1, 2, 3), casein blocked conjugates (4, 5, 6) and BSA blocked conjugates (7, 8, 9), before interaction with serum (1, 4, 7) and after interaction with positive (2, 5, 8) and negative (3, 6, 9) samples. (**B, D**) Electrophoretic mobility of the AuNP-RSA, AuNP-RSA-Casein and AuNP-RSA-BSA conjugates before interaction with human sera (No Serum) and after interaction with the positive sera pool (PosSerum) or the negative sera pool (NegSerum). Shifts (μm.cm/V.s) between AuNP-RSA and negative sera are indicated, evidencing the effect of blocking. Standard deviation bars correspond to triplicate experiments.





**Supplementary Figure 15.** Digital pictures of the triplicate experiments of LFIA strips containing AuNP-Msg-Casein conjugates and AuNP-Kex1-Casein conjugates, tested with sera from patients with (positive samples) and without (negative samples) PcP.

